



Središnja medicinska knjižnica

Hrelec Patrlj, Maša (2011) *Učinak pentadekapeptida BPC 157 na stvaranje ugrušaka u aortnoj anastomozi u štakora [Effect of pentadecapeptide BPC 157 on clot formation at aortal anastomosis in rats]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/1357>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Maša Hrelec Patrlj

**UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC 157
NA STVARANJE UGRUŠAKA U AORTNOJ
ANASTOMOZI U ŠTAKORA**

DISERTACIJA



Zagreb, 2011.godina

Ova disertacija izrađena je na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor: Prof. dr. sc. Predrag Sikirić, dr.med.

Zahvaljujem se dr. Boži Radiću za pomoć u statističkoj analizi, dr. Robertu Kličeku, svom mentoru i svima koji su doprinjeli ostvarenju ove disertacije.

Ovu disertaciju posvećujem svojoj obitelji-
suprugu Leonardu i djeci Noi i Evi.

SADRŽAJ

stranica

1. UVOD	5
1.1 ANATOMIJA KRVNIH ŽILA	5
1.2 FIZIOLOGIJA KRVOŽILNOG SUSTAVA	8
1.3 FIZIOLOGIJA MEHANIZMA ZGRUŠAVANJA KRV	10
1.4 PATOFIZIOLOŠKI ASPEKTI TROMBOZE	12
1.5 NO SUSTAV	13
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	15
3. SVRHA ISTRAŽIVANJA	16
4. MATERIJALI I METODE	18
4.1 POSTUPAK	22
4.2 ANALIZA HODNE PRUGE	26
4.3 FUNKCIONALNA ANALIZA- MFI	26
4.4 PATOHISTOLOŠKA ANALIZA	27
5. REZULTATI	28
5.1 MFI	28
5.2 PHD	41
6. RASPRAVA	45
7. ZAKLJUČCI	49
8. SAŽETAK	50
9. SUMMARY	52
10. LITERATURA	54
11. BIOGRAFIJA	62

1. UVOD

1.1 ANATOMIJA KRVNIH ŽILA

Krvne žile predstavljaju sastavni dio cirkulacijskog sustava, kojim se krv prenosi duži cijelog tijela. Tri su osnovna tipa krvnih žila: arterije (odvode krv iz srca), kapilare (ostvaruju izmjenu tvari između krvi i tkiva), te vene (prijenos krvi od kapilara, natrag u srce).

Sve krvne žile su svojom građom prilagođene fiziološkim potrebama i funkciji koji obavljaju. Bez obzira na tip tri su osnovna sloja od kojih je građena stijenka krvnih žila: tunica intima (interna), tunica media, tunica adventitia.

Tunica intima sastoji se od jednog sloja endotelnih stanica, koje oblažu unutarnju stranu lumena krvne žile. Stanice se nalaze u bazalnom sloju iz kojeg se obnavljaju pema stopi od 1% dnevno. Osim endotela tunicu intimu čini i subendotelni sloj, kojega glavninu čini rahlo vezivno tkivo uz poneku glatku mišićnu stanicu. Kod arterija, tunica intima odvojena je unutarnjom elastičnom membranom od tunice muscularis. Unutarnja elastična membrana građena je od elastinskih vlakana, s otvorima (fenestrama) kroz koje difuzijom prolaze tvari što hrane stanice u dubljim slojevima stijenke krvne žile.

Tunica media građena je od koncentričnih slojeva spiralno poredanih glatkih mišićnih stanica, koje svojim metabolizmom proizvode i izlučuju izvanstanični matriks kojega čine elastična vlakna, te kolagena vlakna uglavnom tipa III, tzv. retikulinska vlakna. U velikim arterijama postoji vanjska elastična membrana koja obavija mišićni sloj, te ga odjeljuje od vanjskog sloja stijenke, tunicae adventitiae.

Tunicu adventitiu uglavnom čine uzdužno poredana vlakna kolagenih i elastičnih vlakana, koja postupno prelaze u okolno vezivno tkivo organa kroz koje određena žila prolazi. Za razliku od mišićnog sloja, u tunici adventitii prevladavaju kolagena vlakna tipa I.

Stanice u slojevima krvnih žila najvećim se dijelom prehranjuju difuzijom iz krvi koja prolazi kroz njihov lumen, međutim kod većih krvnih žila ne, jer su njihovi slojevi predebeli da bi prehrana difuzijom bila dostatna. Stoga su za njihovu prehranu odgovorne tzv. žilne žile (vasa vasorum) koje se granaju unutar vanjskog i površinskog dijela mišićnog sloja.

Za inervaciju stijenke većine krvnih žila odgovorna je gusta mreža nemijeliniziranih simpatičkih vlakana (vazomotorički živci) s adrenalinom kao neurotransmitterom, čijim se otpuštanjem izaziva vazokonstrikcija. Preduvjet uspješnog širenja podražaja jest difuzija neurotransmitera u sve slojeve stijenke, koja je omogućena preko tijesnih (adherentnih ili nexus) spojeva među glatkim mišićnim stanicama. U arterijama skeletnih mišića postoji i inervacija kolinergičnim vlaknima koja uzrokuju vazodilataciju. U arterijama postoje i završeci aferentnih vlakana: baroreceptori (receptori za tlak) u karotidnom sinusu i luku aorte, te kemoreceptori karotidnih i aortalnih tjelešaca.

Krvožilni sustav dijeli se na makrocirkulaciju (žile promjera većeg od 0,1 mm) zaduženu za prijenos tvari kroz organizam, te mikrocirkulaciju (žile promjera manjeg od 0,1 mm, vidljive samo svjetlosnim mikroskopom), koja je odgovorna za izmjenu tvari između žilnog sustava i okolnih tkiva.

S obzirom na građu arterije se odlikuju određenim karakteristikama u odnosu na druge tipove krvnih žila. Njihov mišićni sloj je najdeblji, a gustoća inervacije najgušća. Na osnovi svoje veličine arterije se mogu podijeliti na: arteriole, mišićne arterije (srednjeg i velikog promjera), te velike elastične arterije (*Junqueira i sur., 1999*).

Arteriole su manjeg promjera ($<0,5$ mm) i užeg lumena, koji je obložen endotelnim stanicama sličnim onima kod neprekinutih kapilara. Subendotelni sloj je tanak, unutarnja elastična membrana postoji samo u najvećim arteriolama. Mišićni sloj čini 1-5 slojeva glatkih mišićnih stanica, dok je adventicija vrlo tanka i nema vanjsku elastičnu membranu.

Mišićne arterije čine većinu arterija u tijelu. Unutarnji sloj sličan je onom kod arteriola samo što je nešto deblji. Izražena je unutarnja elastična membrana, dok mišićni sloj tvori oko 40 slojeva glatkih mišićnih stanica. Što je arterija uža to se broj slojeva mišićnih stanica smanjuje. Izvanstanični matriks mišićnog sloja tvore elastična i retikulinska vlakna, te proteoglikani. U većim mišićnim arterijama izražena je vanjska elastična membrana, dok je adventicija dobro razvijena, te se sastoji od kolagenih i elastičnih vlakana, fibroblasta i nešto masnih stanica. Žilne žile i živci uglavnom se nalaze u vanjskom sloju, a kod većih mišićnih arterija prodiru do vanjskog dijela mišićnog sloja.

Velike elastične arterije nazivaju se još i arterije elastičnog tipa. U velike arterije ubrajaju se aorta, plućna arterija, te njihovi veliki ogranci. U svom mišićnom sloju sadržavaju veliku količinu elastina, što im daje žućkastu boju. Svi slojevi osim tunike adventicije su vrlo dobro razvijeni, te su deblji nego kod ostalih tipova arterija. Unutarnji sloj, te subendotelni sloj deblji su nego u mišićnih arterija. Unutarnja elastična membrana dobro je razvijena, ali je isprepletena s elastičnim vlaknima izvanstaničnog matriksa mišićnog sloja. Mišićni je sloj vrlo dobro razvijen. Broj slojeva se tijekom razvoja povećava od 40 slojeva glatkih mišićnih stanica u novorođenčeta, do 70 u odrasla čovjeka. Izvanstanični matriks osobito je bogat elastičnim vlaknima, retikulinskim vlaknima, a osnovna tvar u građi jest hondroitin-sulfat.

Općenito velike arterije se zbog svoje osnovne funkcije provođenja krvi iz smjera srca nazivaju provodne arterije. Uz funkciju prijenosa krvi, one ublažavaju promjene krvnog tlaka. U sistoli se elastični slojevi velikih arterija rastežu, dok u diastoli kada tlak u ventrikulu pada elastični povrat stijenke velikih arterija omogućuje da se tlak održi. Povećanjem udaljenosti od srca arterijski tlak i brzina protoka postaju niži i jednoličniji. Srednje velike arterije nazivaju se i raspodjelne arterije, jer im je glavna uloga opskrba različitih organa krvlju. Mišićni sloj može kontrolirati dotok krvi sukladno utjecaju lokalnih kemijskih i živčanih podražaja (*Junqueira i sur., 1999*).

1.2 FIZIOLOGIJA KRVOŽILNOG SUSTAVA

Krvožilni cirkulacijski sustav može se podijeliti na plućnu cirkulaciju (mali krvotok), te sistemsku cirkulaciju (veliki krvotok ili periferna cirkulacija). Svaki tip krvnih žila u cirkulacijskom sustavu ima određenu ulogu, preduvjet čega je različita histološka građa stijenke krvnih žila. Arterije dovode krv pod visokim tlakom u tkiva. Odlikuju se većom brzinom protoka krvi, te izrazito jakim stijenkama.

Arteriole, kao krajnji ogranci arterijskog sustava, djeluju poput kontrolnih ventila, kroz koje se krv propušta u kapilare. Preduvjet njihove ventilne funkcije jest snažna mišićna stijenka, pomoću koje se može mijenjati veličina lumena, od potpune zatvorenosti, preko različitih stupnjeva djelomične otvorenosti, te konačno potpune otvorenost, pa čak i proširenosti.

Zadaća kapilara jest izmjena tekućine, hranjivih tvari, elektrolita, hormona i drugih tvari između krvi i međustanične tekućine. Morfološki preduvjet za izvođenje takve funkcije su mala debljina stijenke, koja je propusna za tvari male molekularne mase.

Venule prikupljaju krv iz kapilara, te se postupnim spajanjem povećavaju oblikujući vene.

Vene vraćaju krv u srce, odlikuju se nižim tlakom, tankom stijenkom, međutim s dovoljnom količinom mišića kojima je omogućeno stezanje i širenje, čime se ostvaruje glavna uloga vena kao glavnog spremnika krvi u tijelu.

Tri su osnovna načela cirkulacijske funkcije krvožilnog sustava. Protok krvi kroz određeno tkivo, usklađen je s tkivnim potrebama tog tkiva (*Guyton i Hall, 1999*).

Pri porastu aktivnosti, protok kroz određeno tkivo može se povećati 20-30 puta. Na razini mikrocirkulacije nadgledaju se tkivne potrebe, na temelju raspoloživosti kisika i hranjivih tvari, kao i na temelju porasta koncentracije otpadnih tvari i otpadnih metabolita tkiva i ugljik dioksida. Na taj način ostvaruje se tzv. lokalni nadzor protoka krvi, kojim se usklađuje protok krvi kroz tkivo sa tkivnom aktivnošću i metabolizmom.

Srčani minutni volumen nadzire se na temelju ukupnog lokalnog tkivnog protoka (*Guyton i Hall, 1999*). Naime krv se venama vraća u srce koje na povećani dotok krvi (preload) odgovara tako da svu krv odmah izbacuje u arterije (afterload). Na taj način srce djeluje na tkivne potrebe, premda samo ne može u potpunosti regulirati tlak i protok krvi, već mu je za to potrebna potpora viši regulacijskih sustava.

Regulaciju na razini mikrocirkulacije nadopunjavaju tzv. humoralna i autakoidna regulacija u kojoj se pri određenim uvjetima staničnog metabolizma određene molekule pojavljuju u suvišku ili jednostavno dolazi do porasta koncentracije određenih tvari koje djeluju na sfinkterski sustav arteriola, proširujući područje lokalne regulacije krvnog protoka kroz tkivo. Svi navedeni mehanizmi nisu dostatni za adekvatnu regulaciju protoka, kao i održavanje protoka kroz krvne žile, bez učinka viših regulacijskih sustava.

Ukoliko tlak padne ispod kritične razine aktivira se autonomni živčani sustav (simpatikus i parasimpatikus). Autonomni živčani sustav na temelju informacija koje prima preko aferentnih neurona djeluje u dva smjera. S jedne strane djeluje na frekvenciju srca, a s druge strane na tonus krvnih žila. Aktivacija autonomnog živčanog sustava ostvaruje se u vremenskom razdoblju veličine od nekoliko sekundi. Posljedice aktivacije autonomnog živčanog sustava su: povećanje snage srčanog izbacivanja krvi, kontrakcija velikih venskih spremnika, čime se doprema veća količina krvi u srce, uz opću konstrikciju većine arteriola u tijelu, što ima za posljedicu porast količine krvi u arterijskom stablu.

U tijeku nekoliko sati ili dana aktiviraju se bubrezi u sustavu regulacije tlaka, lučenjem hormona koji nadziru tlak te reguliraju volumen krvi.

Na taj se način lokalnom, autonomnom živčanom i bubrežnom regulacijom krvnog tlaka kontrolira perfuzija periferije djelovanjem na rad srca, volumen krvi, te tonusa krvnih žila kako bi se spriječilo da oscilacije tlaka u jednom dijelu organizma, utječu na promjene u drugim područjima (*Guyton i Hall, 1999*).

1.3 FIZIOLOGIJA MEHANIZMA ZGRUŠAVANJA KRV

Prvi korak u pokretanju kaskade mehanizma zgrušavanja krvi jest prekid kontinuiteta endotelnog sloja u krvnoj žili. Odmah po ozljedi endotela aktiviraju se neurogeni refleksi mehanizmi koji su modulirani promjenama u koncentraciji različitih humoralnih čimbenika (npr. endotelin). U fazi po ozljedi endotela najaktivniji su čimbenici koji ispoljavaju vazokonstriktorno djelovanje, zbog čega dolazi do vaskularne kontrakcije. Taj vaskularni spazam predstavlja prvi korak, a ujedno i fiziološki mehanizam, koji se prvi aktivira u pokretanju hemostatskog fiziološkog procesa u organizmu. Vaskularni spazam jest kratkoročna reakcija, te postupno nastupa relaksacija, koja bi dovela do nastavka krvarenja, međutim, ubrzo po primarnom vazospazmu aktiviraju se trombociti i koagulacijski sustav. U hemostatskom procesu 3 su glavna čimbenika odgovorna za adekvatnu aktivaciju i funkciju hemostaze: 1. oštećenje endotelne stanice; 2. trombociti; 3. koagulacijski sustav (*Kumar i sur., 2000*). Endotelne stanice djeluju na više točaka hemostaze, jer istovremeno posjeduju antitrombotna, antikoagulantna i fibrinolitička svojstva, ali u određenim okolnostima pokazuju i prokoagulantno djelovanje. Sve dok je endotel neoštećen, trombociti i koagulantne bjelancevine su odvojene i izolirane od subendotelne trombogeničke komponente (npr. kolagen). Rezultat toga je da trombociti u cirkulaciji ne adheriraju na stijenku krvne žile, sve dok se ne aktiviraju. Po aktivaciji trombocita mijenjaju se njihova svojstva, međutim adherirati će samo na mjestu oštećenja endotela. Adhezija će izostati na mjestima očuvanog endotela zbog djelovanja PGI₂, te NO koji djeluju kao inhibitori agregacije trombocita i vazodilatatori.

Antikoagulantna svojstva osiguravaju heparinu slične molekule vezane za membranu, te trombosmodulin (specifični receptor za trombin). Navedene molekule djeluju posredno, a rezultat njihova djelovanja jest kataliziranje antitrombina III koji inaktivira trombin i neke

druga faktore (npr. Xa). Vezanjem trombina za trombomodulin trombin iz prokoagulant prelazi u antikoagulant, na način da se aktivira protein C koji proteolitičkim cijepanjem faktora Va i VIIIa koči zgrušavanje. Pored navedenoga endotelne stanice aktiviranjem plazminogena potiču fibrinolitičku aktivnost u krvi, te na taj način uklanjaju fibrinske naslage s endotelnih površina.

Endotelne stanice sprječavaju adhezije trombocita i početak zgrušavanja krvi, međutim njihovim oštećenjem prekida se antikoagulacijski mehanizam, te dolazi do aktivacije hemostaze, a u patološkim uvjetima i tromboze.

Oštećenjem endotela pokreće se hemostatski proces, trombociti se izlažu subendotelnim čimbenicima, od čega je posebno značajan kolagen, te dolazi do aktivacije trombocita . Aktivirani trombociti se vežu za mjesto na žili s oštećenim endotelom (adhezija), te dolazi do jačeg otpuštanja (sekrecije) istih, uz agregaciju. Adhezija, reakcija otpuštanja (sekrecija), te agregacija pojave su koje opisujemo kao aktivaciju trombocita (*Kumar i sur.,2000*).

Za adheziju trombocita za kolagen osobito je važna interakcija s von Willebrand faktorom koji preko glikoproteina Ib na površini trombocita ostvaruje vezu sa subendotelijalnim kolagenom. Treća komponenta hemostaze jest koagulacijski sustav, koji počiva na nizu pretvorbi proenzima u aktivne enzime, rezultirajući u konačnici sa stvaranjem trombina koji topljivi fibrinogen u plazmi pretvara u netopljivi vlaknati fibrin. Svaka reakcija u kaskadi odvija se na fosfolipidnoj površini, a sastoji se od reakcijskog kompleksa koji čine enzimi (aktivirani faktor koagulacije), supstrat (proenzimska forma faktora koagulacije) i kofaktor (akcelerator reakcije). Za održavanja navedenih komponenti sakupljenih na jednom mjestu važna je uloga kalcijevih iona. Lokaliziranošću reakcija hemostatske kaskade, omogućeno je djelovanje iste samo na određeni segment krvne žile, gdje je oštećen endotel. Uobičajeno je koagulaciju pratiti kroz unutrašnji i vanjski put koji se ujedinjuju u točki kada se aktivira faktor X, iako postoji više veza između pojedinih krakova. Pokretnuta kaskada stabilizira se

antikoagulantima, koji ograničavaju proces samo na mjesto gdje je oštećen endotel (antitrombini, proteini C i S, plazminogen-plazminski sustav), te završavaju proces zgrušavanja nakon što se formira tromb.

1.4 PATOFIZIOLOŠKI ASPEKTI TROMBOZE

Osnove za stvaranje tromba su oštećenje endotela, staza ili vrtložasto kretanje krvne struje i hiperkoagulabilnost krvi, poznate kao Virchovljeve trijase.

Oštećenje endotela dominantan je čimbenik u trombogenezi. Kao što se i hemostatska kaskada pokreće prekidom kontinuiteta endotela, te posljedičnom aktivacijom trombocita zbog interakcije sa subendotelnim kolagenom, pojava tromba u patološkim stanjima također počiva na oštećenju endotela. Pod oštećenjem endotela podrazumijevamo brojna stanja: ulceracija plaka u aterosklerotski promijenjenim arterijama, oštećenje endokarda, koja mogu biti posredovana različitim rizičnim čimbenicima: hemodinamski stres u hipertenziji, bakterijski toksini, homocistinurija, hiperkolesterolemija i sl. Oštećenje endotela ne mora nužno biti opsežno, dovoljna su i mala, često čak i mikroskopski nevidljiva oštećenja.

Staza i vrtložasto kretanje predstavljaju važne trombogene čimbenike. Razbijanjem laminarnog toka krvi turbulentnim gibanjem stvaraju se uvjeti za oštećenje endotela, a stazom se omogućuje kontakt trombocita s endotelom, pa tako i s njegovim oštećenjima. Staza sprječava razrijeđenje aktiviranih faktora zgrušavanja, dovodeći tako do porasta njihove koncentracije. Istovremeno se mjestimičnim usporanim tokom usporava dotok inhibitora faktora zgrušavanja, te omogućuje nagomilavanje novostvorenog fibrina i aktiviranih trombocita.

Treći element Virchovljeve trijase jest hiperkoagulabilnost, koja podrazumijeva određenu promjenu ili poremećaj u mehanizmu zgrušavanja, koji na taj način stvara sklonost prema

trombozi. Različita stanja mogu uzrokovati ili se povezuju s nastankom hiperkoagulabilnosti: prirođeni defekti pojedinih faktora zgrušavanja, oštećenja jetre, diseminirana maligna bolest, primjena oralnih kontraceptiva, autoimune bolesti i sl.

Revaskularizacijske intervencije i operacijski zahvati također predstavljaju rizik za nastanak tromboze. Neovisno o kojem se tipu intervencije radi (endarterektomija, premoštenje, postavljanje stenta), svaka je od njih mehanička i kao takvoj pridruženo joj je određeno oštećenje endotela koje je dovoljno za stvaranje tromba (*Norton i sur., 2000; Townsend i sur., 2008.; Šoša i sur., 2007*). Stoga se uz svaku rekaskularizacijsku intervenciju provodi tromboprofilaksa, koja kod nekih oblika intervencije mora trajati doživotno. Nakon revaskularizacije procesom intimalne hiperplazije i remodeliranja koji su neizostavni, također dolazi do mogućnosti obliteracije lumena. Posljedično tome nastaju restenoze i reokluzije, a njihova učestalost ovisi o lokacije gdje je provedena intervencija, tipu intervencije, tehničkoj izvedbi, te materijalu koji je upotrijebljen (*Norton i sur., 2000*).

1.5 NO SUSTAV

NO sustav (nitric oxide) je značajan u mnogim procesima i predstavlja predmet opsežnih istraživanja unazad par desetljeća (*Furchgotf i Zawadzki, 1980*). Jedan je od endogenih mehanizama koji prevenira agregaciju trombocita na endotel. Stvara se iz L-arginina i kisika u prisustvu nekoliko kofaktora, endotelne NO sintaze (eNOS) koja je jedna od tri izoforme NOS. Endotelne stanice će izlučiti NO kao odgovor na vezanje agonista na endotelne receptore (npr. bradikinina, histamina, ATPa i sl) ili nakon oštećenja endotela. Uloga NOa kao inhibitora adhezije i aktivacije trombocita opisana je na mnogim modelima, iako sam mehanizam još nije u potpunosti razjašnjen (*Rumbaut, 2010*).

U cirkulaciji je glavna uloga iz endotela poteklog NO dilatacija krvnih žila i inhibicija agregacije i adhezije trombocita. Endotel reagira na promjene intraluminalnog protoka i kemijskog sastava, te sukladno tome modificira otpuštanje NO (*Collier i Vallance , 1991*).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Hipoteza

Pentadekapeptid BPC 157 potiče cijeljenje aorto- aortalne anastomoze u štakora , sprječava stvaranje tromba na anastomozi, a primjenjen u posttretmanu djeluje trombolitički.

Učinak BPC 157 na tromb moći će se pratiti klinički promjenom snage stražnjih ekstremiteta štakora.

Ciljevi istraživanja

- Utvrditi učinak pentadekapeptida BPC 157 na formiranje tromba na mjestu anastomoze i na cijeljenje aorto-aortalne anastomoze (odmah i nakon 24 sata)
- Ispitati postoji li izravan učinak na arterijski tromb
- Pratiti posljedice primjene BPC 157 preko praćenja mišićne funkcije kao temeljnog parametra cijeljenja

3. SVRHA ISTRAŽIVANJA

Na temelju rezultata dosadašnjih istraživanja postoji više različitih načina kojima se pokušalo utjecati na tijek i ishod cijeljenja aortalne anastomoze (*Haraguchi i sur., 2007; Sako i sur., 2006; Kuhan i Raptis, 1997*). Jedan od pravaca istraživanja svakako ide i u smjeru citoprotektivne teorije (*Robert, 1979*), koja u sebi sadrži elemente zaštitnog djelovanja na endotel (*Szabo i sur., 1985*), te peptidne antiulkusne citoprotekcijske terapije (*Sikiric i sur., 1999*), što može predstavljati pravce u liječenju komplikacija cijeljenja aortalne anastomoze.

Povezanost između želučane citoprotekcije i njezine moguće primjene u suzbijanju tromboze i cijeljenju aortalne anastomoze, proizlazi iz činjenice kako održavanje integriteta želučane sluznice uključuje u sebi i održavanje kontinuiteta endotela krvnih žila (*Sikiric i sur., 1999; Kwiecien i sur., 2008; Brzozowski i sur., 2008*). Očuvanje endotela, prema teoriji citoprotekcije, predstavlja osnovu za očuvanje integriteta želučane sluznice (*Robert, 1979; Szabo i sur., 1985; Sikiric i sur., 1999; Kwiecien i sur., 2008*).

Sukladno tome u istraživanju je primijenjen citoprotektivni antiulkusni agens, kao inicijator cijeljenja aortalne anastomoze, te kao čimbenik koji će prevenirati ili smanjiti stvaranje tromba (primijenjen odmah po kreiranju anastomoze) ili će razgraditi već stvoreni tromb na mjestu anastomoze (primjen 24 sata nakon operacije). Kao parametar praćenja analiziran je opravak funkcije donjih ekstremiteta.

Pentadekapeptid BPC 157 (u daljnjem tekstu BPC 157) u istraživanju je primijenjen kao ispitivana supstanca čiji se učinak na postavljeni model ispitivao. Riječ je antiulkusnom peptidu (*Kwiecien i sur., 2008; Sikiric i sur., 1994; Sikiric i sur., 1997; Veljaca i sur., 1995*) stabilnom u ljudskom želučanom soku, sa značajnom citoprotektivnom aktivnošću (*Sikiric i sur., 1994; Sikiric i sur., 1997; Veljaca i sur., 1995*). Za pentadekapeptid BPC 157 utvrđena je sigurnost primjene (LD1 u toksikološkim analizama nije postignuta), te nisu utvrđene

nuspojave (*Veljaca M i sur., 2003*). Pentadekapeptid BPC 157 dokazao se učinkovitim u kliničkim istraživanjima u terapiji upalnih bolesti crijeva i cijeljenja rana (*Ruenzi i sur., 2005; Sikiric i sur., 2003; Novinscak i sur., 2008*). Istraživanja su pokazala njegovo zaštitno djelovanje na endotel (*Sikiric i sur., 1997*), te angiogenezu (*Brcic i sur., 2009*).

Iako je implicirano da su mnoge supstance na neki način povezane s NO sustavom, vrlo malen broj studija govori o utjecaju na NO-prekursore, efekte NOS-blokera i efekte NO-prekursor + NOS- bloker veze. Pentadekapeptid BPC 157 je u svim studijama pokazao poveznicu s navedenim spojevima, što naglašava njegov potencijal.

U mnogim je studijama pokazano da BPC 157 utječe na otpuštanje NO, posebno njegov antagonizam na efekt NOS-blokera, L-NAME, NO-prekursora te L-arginina u raznim tkivima, u raznih životinjskih vrsta, te njegov učinak na modulaciju funkcije NO-sustava (hipertenzivni učinak L-NAME preveniran je i uklonjen primjenom pentadekapeptida BPC 157) (*Sikiric i sur., 1997; Balenovic i sur., 2009*). Na taj način je moguće objasniti i širok raspon pozitivnih učinaka BPC 157.

BPC 157 pokazao se aktivnijim od rekombinantnog humanog čimbenika odlaganja trombocita (PDGF-BB), preko stimulacije i ekspresije egr-1 gena, te represora NGF 1 (NAB2) (*Tkalcevic i sur., 2007*). Pored navedenog, BPC 157 se pokazao učinkovitim u cijeljenju ileoilealne, kolokolične, ileojejunalne anastomoze (*Sever i sur., 2009*), kao i gastrokutanih i kolokutanih fistula (*Skorjanec i sur., 2009; Klicek i sur., 2008*). Nadalje, dokazana je učinkovitost pentadekapeptida BPC 157 u cijeljenju transeciranog ishijadičnog živca u lokalnoj, peroralnoj i sistemske primjeni (*Gjurasin i sur., 2009*).

U analizi učinka na stvaranje tromba pentadekapeptid BPC 157 spriječio je stvaranje tromba na mjestu kreirane aortalne anastomoze, a samim time i prijeteću ishemiju donjeg ekstremiteta (*Hrelec i sur., 2009*).

4. *MATERIJALI I METODE*

U istraživanju su provedeni operativni zahvati na 100 muških Wistar albino štakora tjelesne mase 350- 400 g iz uzgojne stanice Zavoda za farmakologiju

Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi postupci učinjeni su sukladno standardima propisanim od strane nadležnog Etičkog povjerenstva.

Prije pokusa eksperimentalne su životinje boravile u uvjetima prirodnih ciklusa svjetla i mraka, bile su smještene u standardnim kavezima na ujednačenoj sobnoj temperaturi i uz slobodan pristup hrani i vodi.

Istraživanje je provedeno u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja (NN

19/99), a odobreno je od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Broj životinja u skupini određene tjelesne mase je slijedeći:

Tjelesna masa	350	360	370	375	380	385	390	395	400
Broj životinja	7	6	5	11	20	3	17	7	24

Životinje su operirane u općoj anesteziji, za koju su korišteni ketamin (Ketamine 0,5-4mg/kg i.p., Ketanest, Parke-Davis GmbH, Berlin,Njemačka) i diazepam (Normabel 0,04-0,2mg/kg i.p., Belupo, Ludbreg, Hrvatska).

Tretirane životinje primale su Pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADDAGLV, Mr 1419; Diagen, Ljubljana Slovenija) u koncentraciji od 10 µg/kg i 10 ng/kg intraperitonealno, te od 10 µg/kg per os. U istraživanju je korišten peptid čistoće 99%, kako je određeno

visokotlačnom kromatografijom – HPLC (1-des-Gly peptid kao onečišćenje), otopljen u fiziološkoj otopini (Pliva, Zagreb, Hrvatska).

U kontrolnoj skupini životinja korištena je fiziološka otopina - 0,9 % NaCl u količini od 5 mL/kg.

Za operaciju su korišteni standardni kirurški instrumenti prilikom otvaranja i zatvaranja abdomena te mikrokirurški instrumenti u pristupu retroperitoneumu te u kreiranju anastomoze.

Anastomoza je učinjena uz pomoć binokularnih kirurških lupa (Heine, Njemačka) s povećanjem 3x. Konac korišten za postavljanje šavi bio je Prolen 8/0 odnosno 9/0 ovisno o promjeru aorte.

Sve životinje su svrstane u 10 skupina s 10 životinja po skupini. Prvih pet skupina svrstano je u tzv. kotretman, a drugih 5 u posttretman. Nakon svakog zahvata eksperimentalne životinje su se vraćale u standardne kaveze, tako da su u svakom kavezu bile životinje iz iste skupine.

U prvoj skupini su životinje koje su nakon formirane anastomoze primile lokalno apliciran BPC 157 u koncentraciji od 10 µg/kg. U drugoj skupini odmah po kreiranju anastomoze bio je apliciran BPC 157, ali u koncentraciji od 10 ng/kg. Treća skupina je kontrolna- po kreiranju anastomoze aplicirana je fiziološka otopina lokalno (5 mL/kg). Četvrta skupina je nakon formirane anastomoze primila per os BPC 157 10 µg/kg, a u petoj (kontrolnoj) skupini je per os aplicirana fiziološka otopina (5 mL/kg). Prvih 5 skupina je nazvano „kotretman“ jer su dobile BPC 157 odnosno fiziološku otopinu odmah po kreiranju anastomoze.

Skupine od 6- 10 se nazivaju posttretman jer su BPC 157 odnosno fiziološka otopina primjenjeni 24 sata nakon kreiranja anastomoze.

Skupina pod brojem 6 je 24 sata nakon kreiranja anastomoze primila BPC 157 u koncentraciji od 10 µg/kg intraperitonealno, skupina 7 je primila 10 ng/kg u isto vrijeme i na isti način. U skupini 8 kontroliran je put primjene tako da je 24 sata nakon kreiranja anastomoze aplicirana

fiziološka otopina (5 mL/kg). Skupina 9 je primila 10 µg/kg BPC 157-a per os, 24 sata nakon zahvata, a u skupini 10 je per os primjenjena fiziološka otopina (Tabl.1).

Tablica 1. Skupine ispitivanih životinja i vrsta tretmana

	SKUPINA	TRETMAN	NAČIN PRIMJENE	VRIJEME PRIMJENE
1	KOTRETMAN	BPC 157- 10 µg/kg	Lokalno, na mjesto anastomoze	Odmah po kreiranju anastomoze
2	KOTRETMAN	BPC 157- 10 ng/kg	Lokalno, na mjesto anastomoze	Odmah po kreiranju anastomoze
3	KONTROLA	NaCl	Lokalno, na mjesto anastomoze	Odmah po kreiranju anastomoze
4	KOTRETMAN	BPC 157- 10 µg/kg	Per os	Odmah po kreiranju anastomoze
5	KONTROLA	NaCl	Per os	Odmah po kreiranju anastomoze
6	POSTTRETMAN	BPC 157- 10 µg/kg	intraperitonealno	24 sata nakon operacije
7	POSTTRETMAN	BPC 157- 10 ng/kg	intraperitonealno	24 sata nakon operacije
8	POSTTRETMAN	BPC 157- 10 µg/kg	Per os	24 sata nakon operacije
9	KONTROLA	NaCl	intraperitonealno	24 sata nakon operacije
10	KONTROLA	NaCl	Per os	24 sata nakon operacije

4.1 POSTUPAK

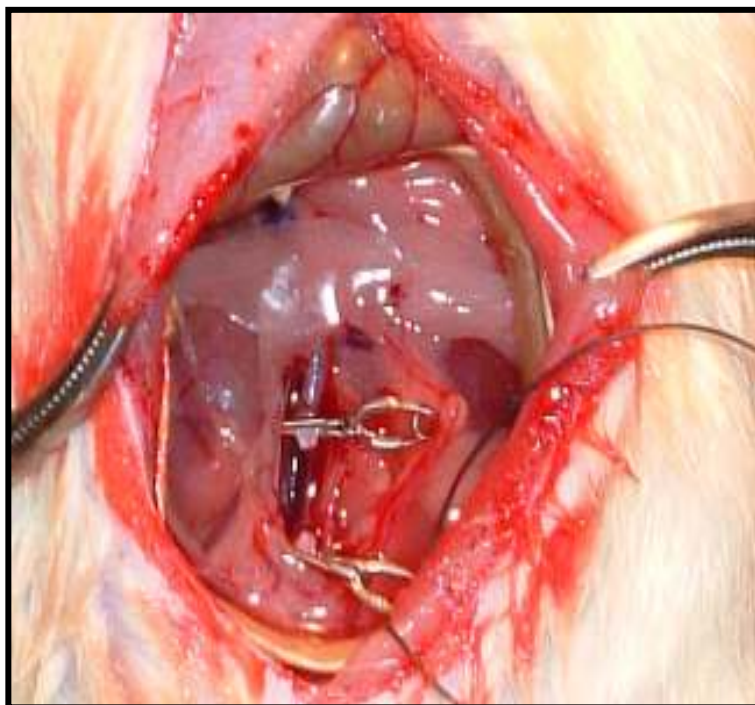
Životinja je nasumično uzeta iz kaveza i stavljena na vagu. Nakon što je zadovoljila kriterij tjelesne mase (350-400g) i klinički test hodne pruge (vrijednost 1), uključena je u istraživanje i označena brojem. Učinjen je test mišićne snage donjih ekstremiteta (motor function index-MFI) na za to predviđenoj vagi kojom se prikazuje težina pritiska stopalom eksperimentalne životinje na mjernu površinu vage kada se štakor nalazi u pravilnom položaju za mjerenje. Pravilan položaj za mjerenje znači da ispitivač mora držati štakora u uspravnom stavu sa spontano ekstenziranom stražnjom nožicom koja se ispituje. U takvom položaju usmjeri se nožicu na mjernu površinu vage, a u trenutku kontakta stopala s ravnom plohom vage štakor se instiktivno odguruje od plohe upotrebljujući silu ekstenzornih mišića potkoljenice. Rezultat toga pritiska očitavao se u obliku mase na skali vage. Test se izvodi tri puta za svaku stražnju nožicu, a bilježi se srednja vrijednost. MFI se tako iskazuje s dvije brojke odvojene kosom crtom, tako da je prva vrijednost lijeve nožice, a druga vrijednost desne nožice. Ispitivane vrijednosti su uglavnom bile jednake s iznimkom nekoliko životinja gdje je bila razlika u vrijednostima. Navedena razlika nije bila statistički značajna.

Nakon što je izmjeren MFI, životinja se uvodi u opću anesteziju primjenom ketamina (0,5-4mg/kg) i diazepama (0,04-0,2mg/kg). Oba lijeka se apliciraju intraperitonealno, nakon čega se životinja vraća u kavez dok lijekovi ne postignu učinak. Smatra se da je životinja uspavana za operaciju ako ne postoji reakcija na dodir kapaka, disanje je duboko, a tijelo mlohavo. Štakor se postavlja na podlogu za operaciju u leđni položaj, tako da su mu svi ekstremiteti atraumatski fiksirani gumenim trakama.

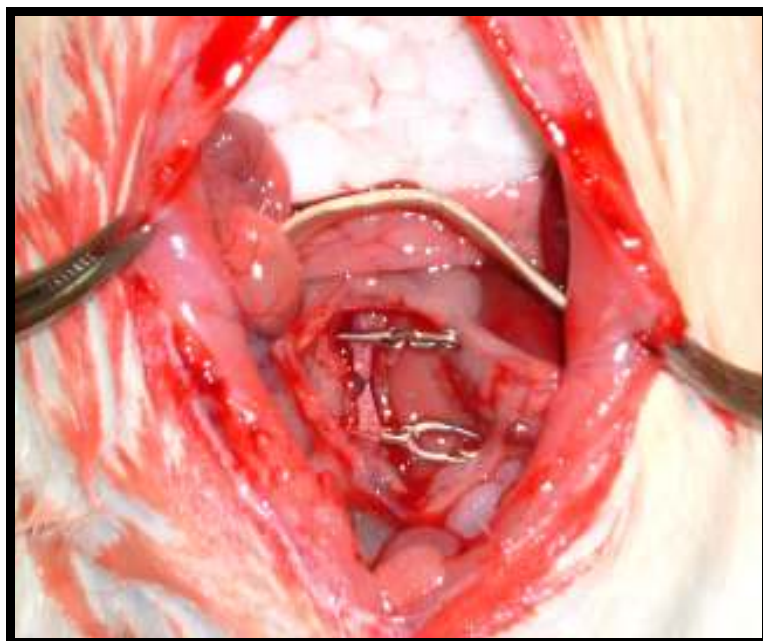
Operativni zahvat započinje medijanom laparotomijom koja se proteže od ksifoida do suprapubične regije. Koža se razmakne aluminijskim retraktorima, a intraperitonealni sadržaj se pažljivo postavi ekstraabdominalno i pokrije vlažnim tupferom. Otvori se retroperitoneum i pristupi identifikaciji aorte i donje šuplje vene. Nakon utvrđivanja mjesta za anastomozu

(između izlazišta renalnih i ilijačnih arterija) pristupi se odvajanju aorte od vene i preparacija aorte u dužini od cca 2 cm. Nakon podvezivanja eventualnih izlaznih arteriola na navedenom segmentu, postavljaju se vaskularne klemme. Razmak između klemma iznosi cca 1,5 cm. Mikro škarama se učini transekcija aorte (Sl. 1), a nakon ispiranja proksimalnog i distalnog segmenta fiziološkom otopinom pristupi se postavljanju prvog šava (Sl.2). Za anastomozu je korišten Prolen 8-0 odnosno 9-0 ovisno o promjeru krvne žile. Da bi se izbjeglo stvaranje stenoze na mjestu anastomoze, umjesto produžnog šava korišteni su pojedinačni šavi. Da bi se postigla optimalna adaptacija i evertracija rubova bilo je potrebno od 5-8 šavi, u prosjeku 7. Nije bilo statistički značajne razlike u rezultatima s obzirom na veličinu konca, niti na broj postavljenih šavi. Nakon postavljanja zadnjeg šava, otpusti se distalna klemma i učini kontrola anastomoze pri retrogradnom protoku. U slučaju da je anastomoza bila nezadovoljavajuća, u smislu jačeg krvarenja i potrebe za daljnjim postavljanjem šavi, životinja je isključena iz istraživanja. Nakon procjene da je anastomoza dobra, da nema curenja ili je ono neznatno, otpustila se i proksimalna klemma (Sl. 3). Uredan protok kroz anastomozu procijenio bi se palpiranjem pulzacija na aorti distalno od anastomoze. Nakon toga je, *skupini 1* lokalno apliciran BPC 15710 µg/kg, *skupini 2* BPC 15710 ng/kg, *skupini 3* NaCl (5ml/kg). *Skupina 4* je primila BPC 15710 µg/kg per os, a *skupina 5* NaCl per os. Ako je životinja pripadala jednoj od skupina 5-10, bez tretmana je vraćena u kavez.

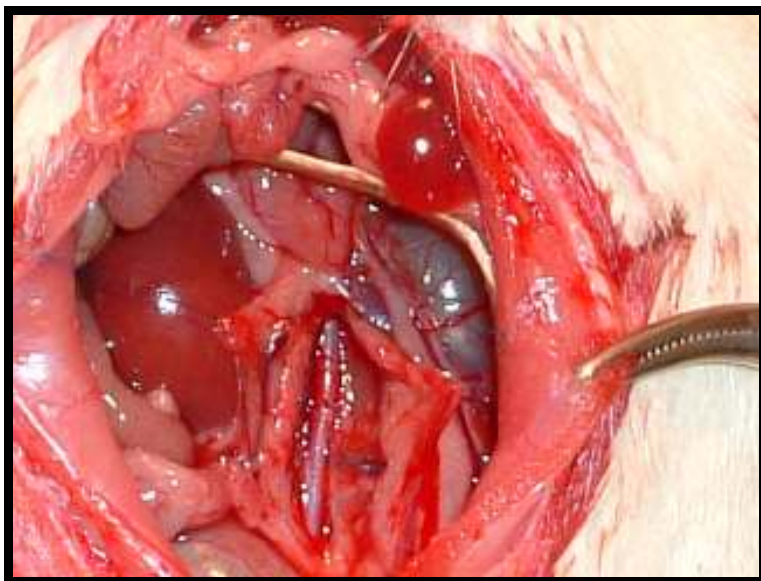
Slika 1. Transekcija aorte



Slika 2. Postavljen prvi šav anastomoze



Slika 3. Gotova anastomoza



Operacija je završena vraćanjem crijeva u abdominalnu šupljinu, te zatvaranjem abdomena u jednom sloju koncem Vycril 2-0. Ukupno trajanje ishemije (vrijeme od postavljanja do skidanja vaskularnih klema) iznosilo je 8-20 minuta (prosjek 16,5 minuta). U slučaju da je ishemija trajala dulje od 20 minuta, životinja je isključena iz istraživanja.

Nakon 24 sata pojedina je životinja izvađena iz kaveza, učinjena je procjena hodne pruge, te je ponovljen test motorne funkcije donjih ekstremiteta. Nakon toga je u skupinama 1-5 učinjeno žrtvovanje životinje, a po otvaranju abdomena je uzorak aorte koji se nalazio između dvije vaskularne kleme reseciran, spremljen u puferiranu otopinu formalina (pH 7.4) i upućen na patohistološku analizu.

Kod skupina 6 do 10 učinjen je tzv. posttretman. Ponovno nakon analize hodne pruge i mjerenja MFI-a, u skupini 6 apliciran je *BPC 15710 $\mu\text{g/kg}$ intraperitonealno*, u skupini 7 *BPC 15710 ng/kg intraperitonealno*, u skupini 8 *NaCl intraperitonealno*. Skupina 9 je per os primila *BPC 15710 $\mu\text{g/kg}$* , a skupina 10 *NaCl* također per os. Odmah po aplikaciji preparata ili fiziološke otopine (nakon 1 minute) izmjeren je MFI, a postupak je ponovljen i nakon 3

minute. Nakon drugog mjerenja MFI, učinjena je ponovno i analiza hodne pruge. Nakon svih postupaka životinja je žrtvovana, a odsječak aorte uzet po već opisanom postupku.

4.2 ANALIZA HODNE PRUGE

Analiza hodne pruge provođena je prije operativnog zahvata, kao jedan od kriterija odabira životinja. Ljestvica skorova je formirana uzimajući u obzir način hoda, brzinu hoda, te vokalizaciju (Staresinic i sur. 2006).

Hod je klasificiran brojevima od 1 do 4, gdje broj 1 označava normalan hod, optimalne brzine i usklađenih pokreta, broj 2 usporen, ali normalan hod, broj 3 teturav hod, sa zanašanjem i padovima, uz vokalizaciju, bilo spontanu bilo induciranu, te broj 4 životinje koje ne mogu hodati, niti se osoviti na stražnje noge, s vokalizacijom, bilo spontanom bilo induciranom.

Da bi životinja bila uključena u istraživanje hod mora biti klasificiran brojem 1.

Postupak ocjenjivanja provodi se na način da se životinja postavi na početak mjerne površine (bočno ograđena staza duljine 100 cm). Hod se analizira klinički, a provodi ga stručni suradnik bez saznanja kojoj skupini pripada ispitivana životinja.

4.3 FUNKCIONALNA ANALIZA- MFI

Kao odrednica funkcijskog oporavka eksperimentalnih životinja nakon anastomoze aorte bio je korišten test pritiska ekstenzora.

Test pritiska ekstenzora (engl. extensor postural thrust – EPT, odnosno MFI- motor function index) opisali su Thalhammer i sur. 1995. godine (*Thalhammer i sur. 1995*), a Koka i Hadlock su dokazali da se može upotrebljavati kao potpuno dostatna metoda za praćenje oporavka motoričke funkcije traumatizirane stražnje noge štakora (*Koka i Hadlock, 2001; Staresinic i sur. 2006*).

4.4 PATOHISTOLOŠKA ANALIZA

Uzorci abdominalne aorte dužine oko 2 cm uzeti prilikom žrtvovanja i uloženi u puferiranu otopinu formalina (pH 7.4) primarno su izrezani. Izrezan je dio aorte na kojem je učinjena anastomoza, a rez je poprečan kroz anastomozu. Navedeno anastomotsko mjesto je razrezano, dehidrirano, te uklopljeno u tekući parafin, kako bi se cijeli segment mogao dalje izrezivati na debljinu od 3- 5 μm , te obojati hemalaun- eozinskim bojama.

Mikroskopiranje su proveli nepristrani patolozi, kojima nije bilo poznato kojoj skupini pripada uzorak kojega mikroskopiraju. Od svakog uzorka nasumično su odabrana tri segmenta, koja su snimljena video kamerom (Sony TK1270), te stavljena u ISSA bazu podataka. Tako učinjene snimke su pomoću programa ISSA (Vamstec, Zagreb, Hrvatska) korištene za morfometrijsku analizu okluzije lumena. Na svakom segmentu mjerena je ukupna površina lumena, kao i ukupna površina ugrušaka, a konačan rezultat analize izražen je postotkom lumena zahvaćenog ugruškom.

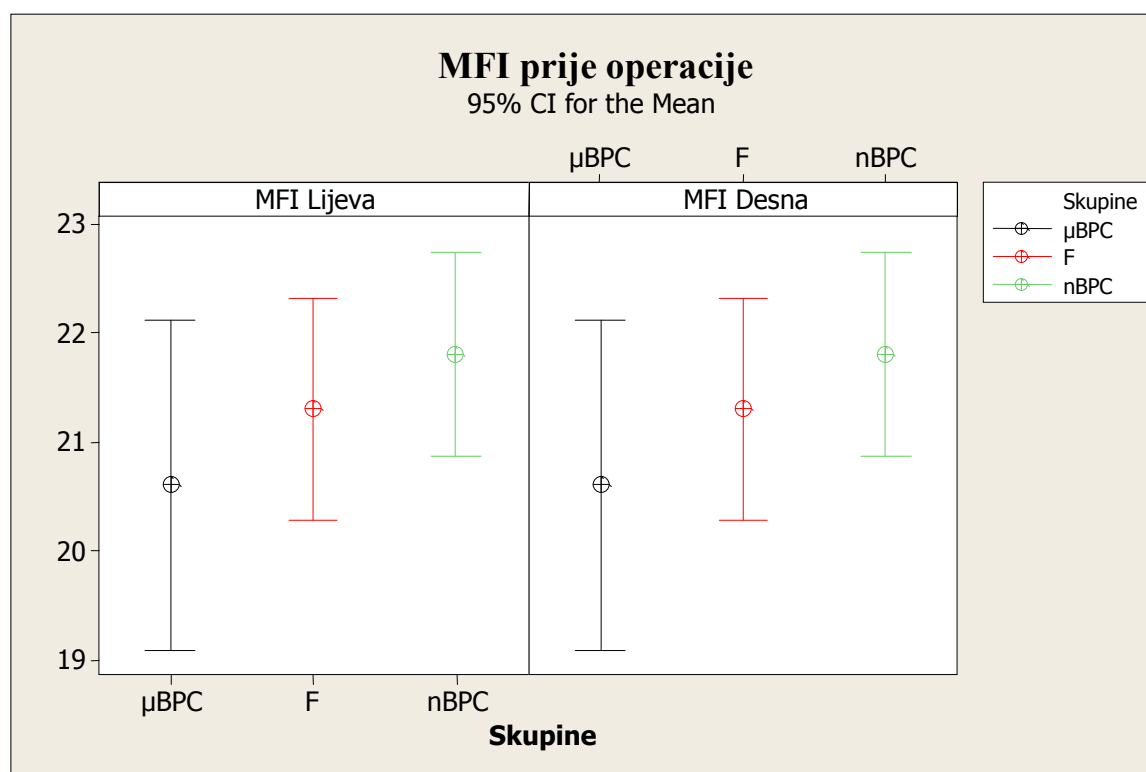
5. **REZULTATI**

5.1 *FUNKCIONALNA ANALIZA- MFI*

Prije i nakon učinjene aortalne anastomoze kontrolirana je funkcija donjih ekstremiteta testom pritiska ekstenzora odnosno testom motorne funkcije (MFI- motor function index). Test je učinjen prije operativnog zahvata svakoj životinji, te 24 sata nakon učinjenog zahvata, neposredno prije žrtvovanja. U posttretmanu, gdje su eksperimentalne životinje tek nakon 24 sata primile BPC 157, odnosno fiziološku otopinu, MFI je učinjen u prvoj minuti nakon aplikacije, te u trećoj minuti.

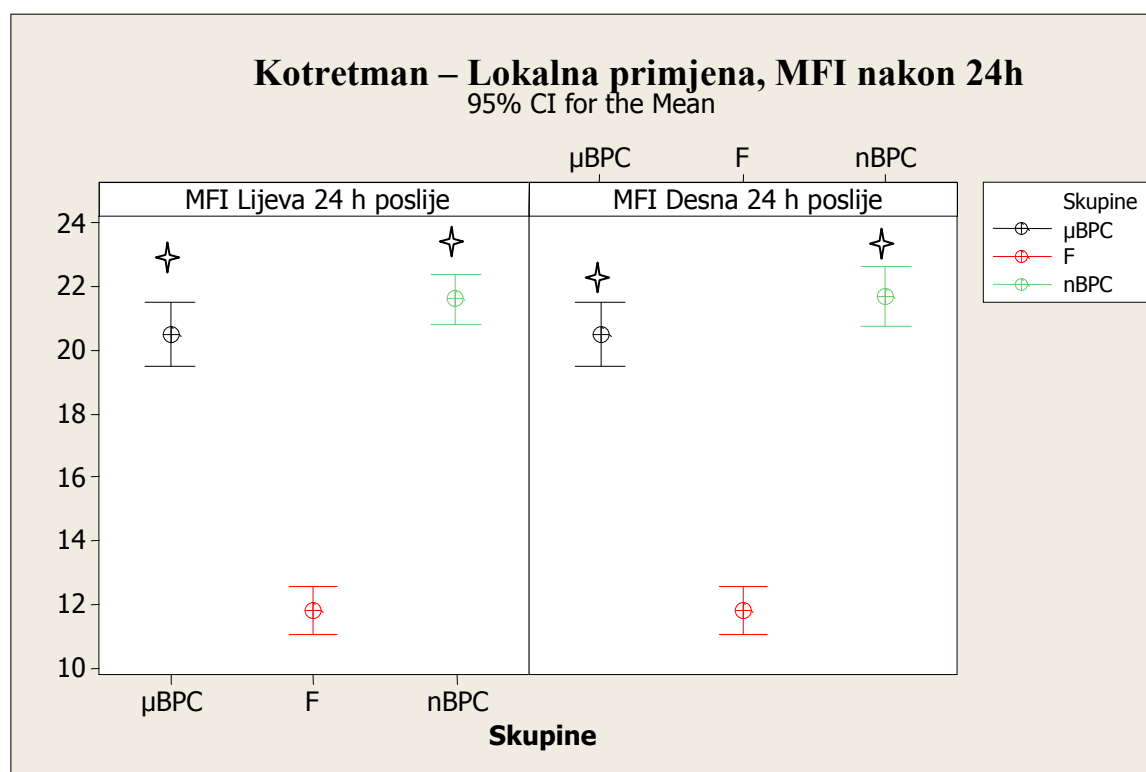
Za sve točke mjerenja nađena je statistički značajna razlika u motoričkom indeksu (Kruskal–Wallisov test; $p < 0.001$ za sve usporedbe) dobivenim tim testiranjem. Posthoc usporedbe pokazale su da se skupine tj. životinje koje su intraperitonealnom (10 $\mu\text{g/kg}$ TT) ili peroralnom primjenom dobivale pentadekapeptid BPC 157, statistički značajno razlikuju od kontrolnih skupina (Mann-Whitneyev U test; $p < 0.001$ za sve usporedbe). Usporedba MFI vrijednosti u skupinama 1,2,i 3 (koje su lokalno nakon zahvata dobile BPC 157 odnosno fiziološku otopinu, pokazala je da nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima izmjerenim prije operativnog zahvata. Također, razlika između vrijednosti motornog indeksa desne i lijeve stražnje noge nije bila statistički značajna (Sl. 4).

Slika 4. MFI vrijednost za skupine 1,2 i 3 prije operativnog zahvata



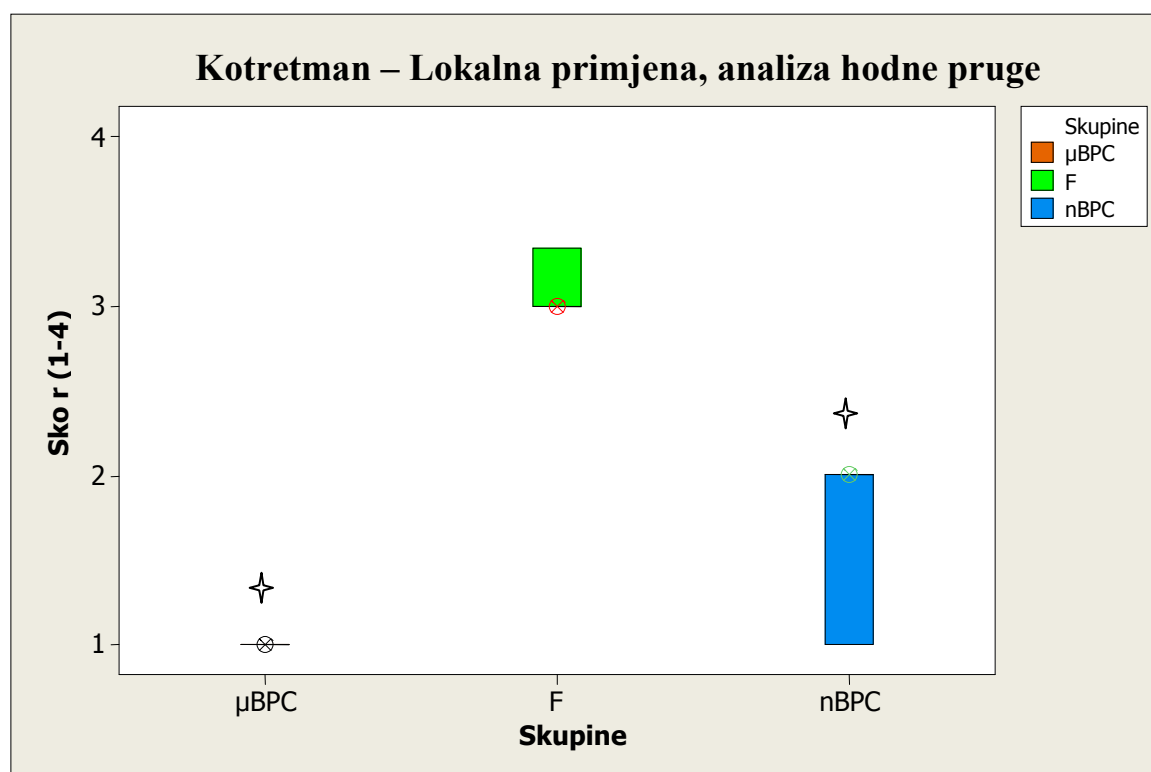
Mjerenje motorne funkcije učinjeno u istim skupinama nakon 24 sata (skupine 1, 2 i 3) pokazalo je da kod životinja kod kojih je primjenjen BPC 157 nije došlo do slabljenja funkcije donjih ekstremiteta (skupine 1 i 2), za razliku od kontrolne skupine (skupina 3) u kojoj je primjećeno smanjenje funkcije donjih ekstremiteta u odnosu na vrijednost prije operativnog zahvata (Sl. 5).

Slika 5. MFI vrijednost za skupine 1,2 i 3 lokalno primjenjenog BPC 157 i F, nakon 24 sata



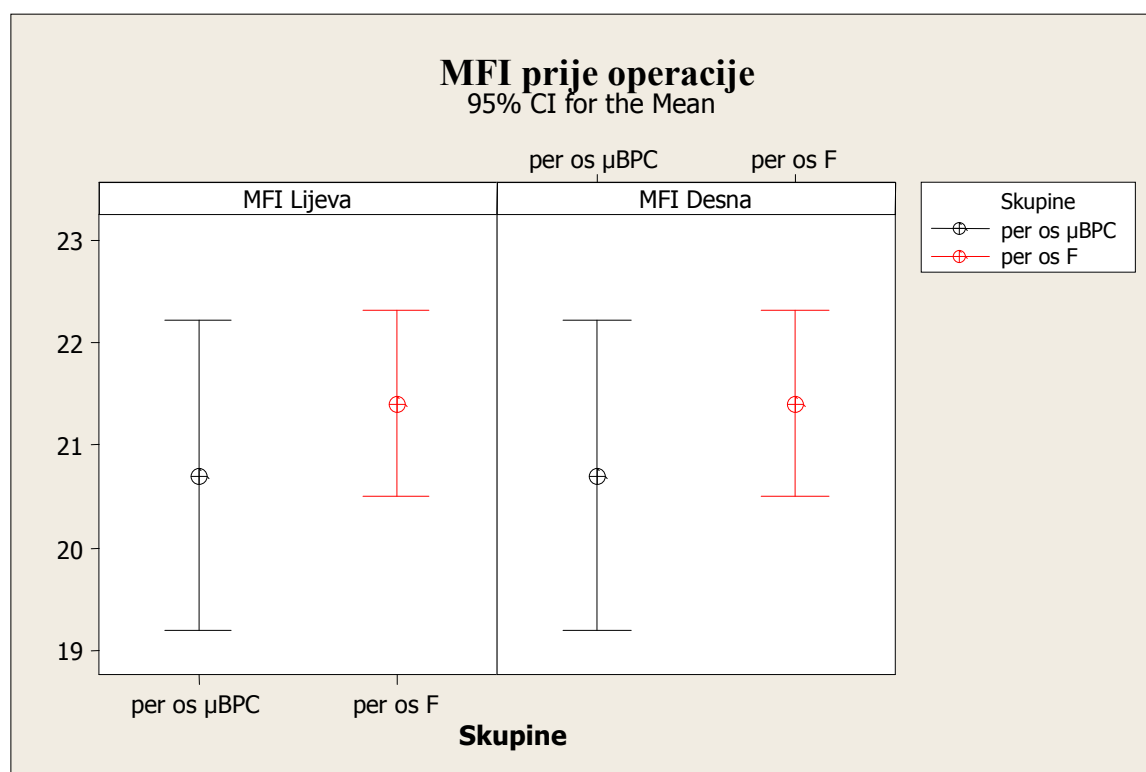
Također, navedenim skupinama životinja analizirana je i kvaliteta hoda. Rezultati te analize podudaraju se s rezultatima motorne funkcije donjih ekstremiteta, odnosno skupine 1 i 2 koje su dobile BPC 157 nisu pokazale pogoršanje kvalitete hoda, za razliku od skupine 3 koja je dobila fiziološku otopinu nakon operacije u kojoj je primjećeno pogoršanje kvalitete hoda (Sl. 6).

Slika 6. Analiza hodne pruge za skupine 1,2 i 3 lokalno primjenjenog BPC 157 i F



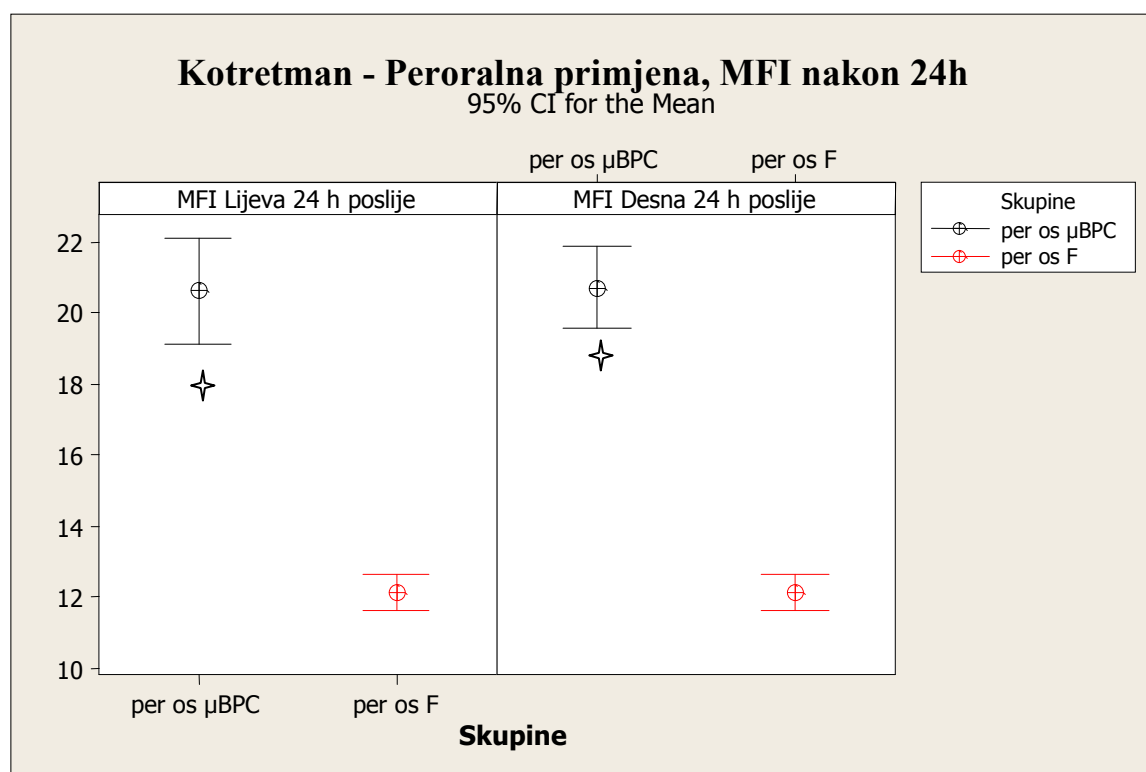
U skupini 4, BPC 157 je primjenjen per os, a u skupini 5 istim putem aplicirana je fiziološka otopina. Mjerenjem MFI prije operativnog zahvata uočeno je da nema statistički značajne razlike u njegovim vrijednostima između skupina 4 i 5 (Sl. 7).

Slika 7. MFI vrijednosti za skupine 4 i 5 prije operativnog zahvata



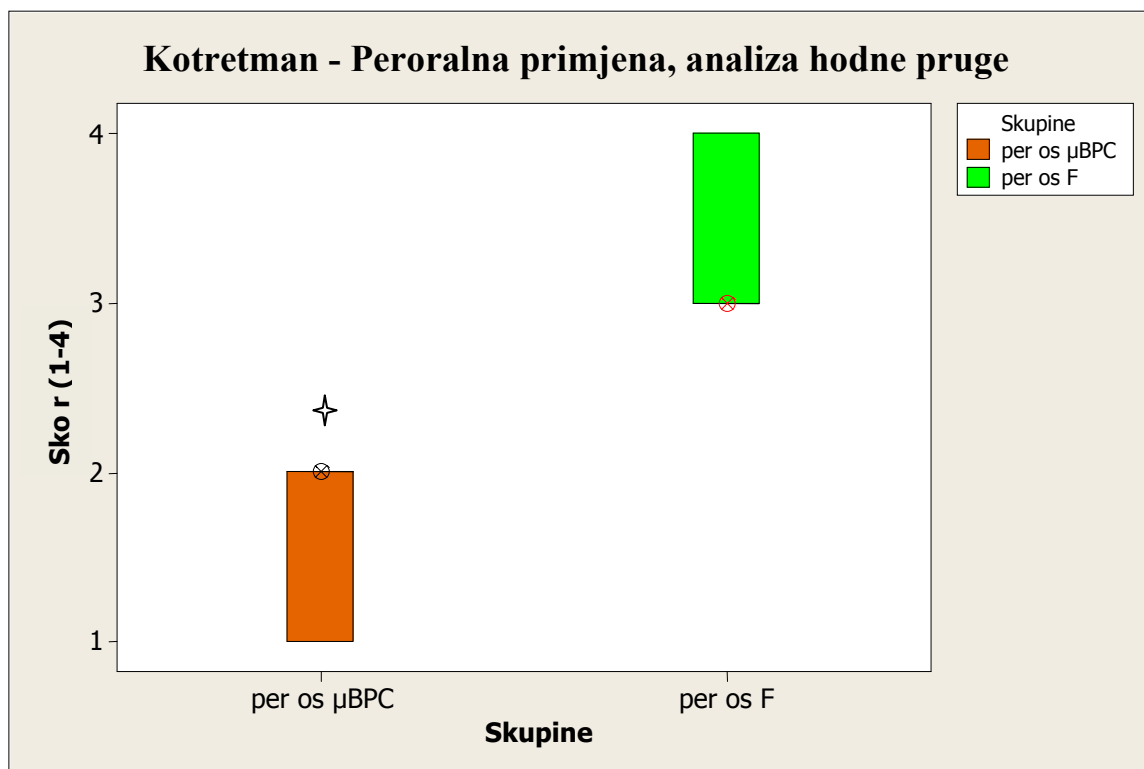
Mjerenje motorne funkcije učinjeno u istim skupinama nakon 24 sata (skupine 4 i 5) pokazalo je da kod životinja kod kojih je primjenjen BPC 157 nije došlo do slabljenja funkcije donjih ekstremiteta (skupina 4), za razliku od kontrolne skupine (skupina 5) u kojoj je primjećeno smanjenje funkcije donjih ekstremiteta u odnosu na vrijednost prije operativnog zahvata (Sl. 8).

Slika 8. MFI vrijednost za skupine 4 i 5 peroralno primjenjenog BPC 157 i F nakon 24 sata



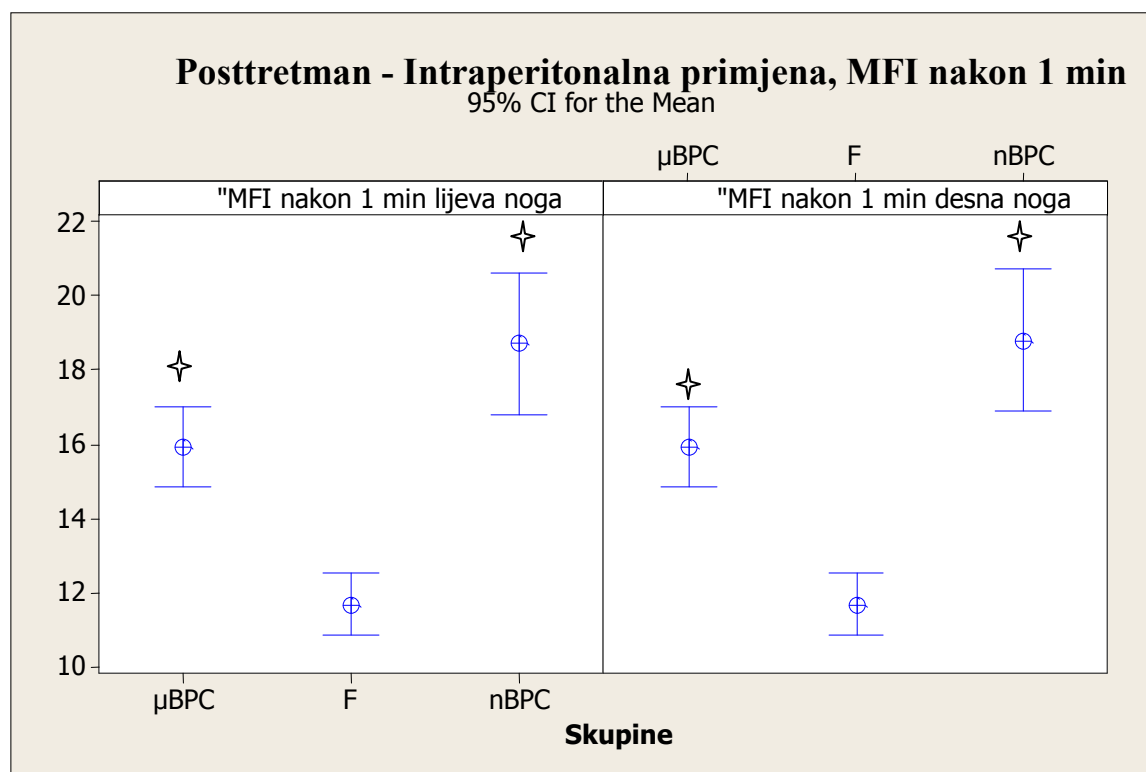
Također, navedenim skupinama životinja analizirana je i kvaliteta hoda. Rezultati te analize podudaraju se s rezultatima motorne funkcije donjih ekstremiteta, odnosno skupina 4 koja je dobila peroralno BPC 157 nije pokazala pogoršanje kvalitete hoda, za razliku od skupine 5 koja je dobila peroralno fiziološku otopinu nakon operacije, kod koje je primjećeno pogoršanje kvalitete hoda (Sl. 9).

Slika 9. Analiza hodne pruge za skupine 4 i 5 lokalno primjenjenog BPC 157 i F



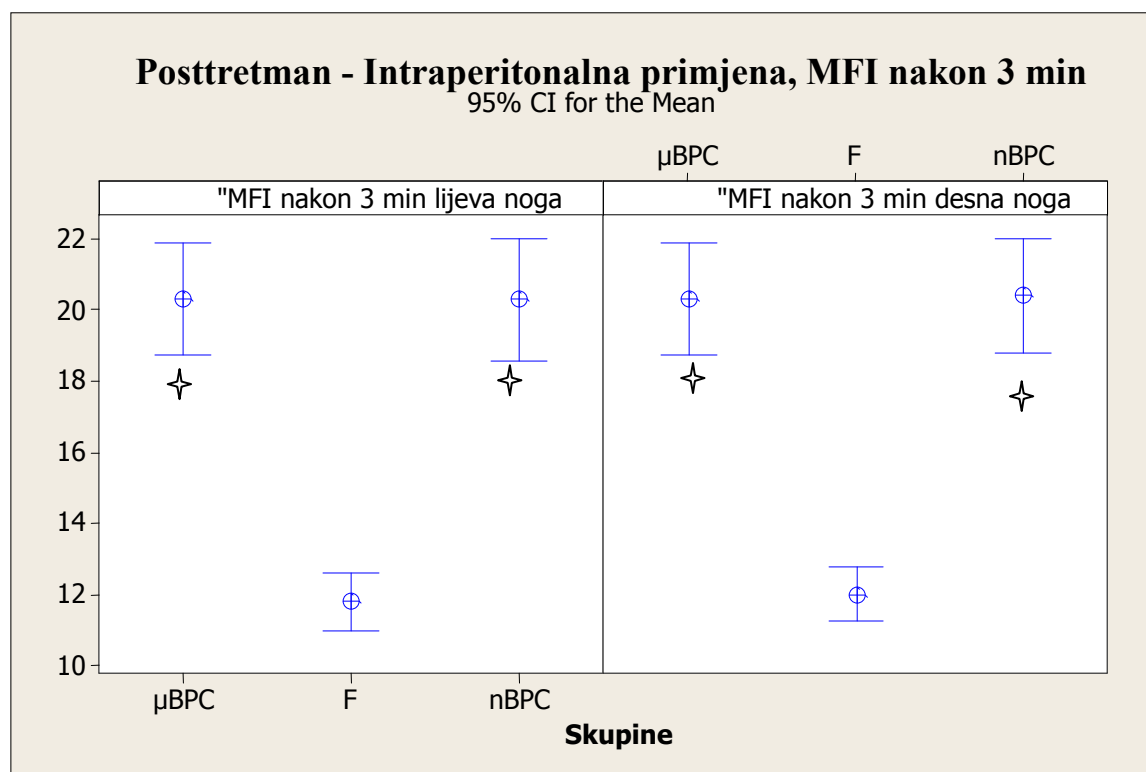
Analizom skupina u tzv. posttretmanu, odnosno skupina koje su tretirane 24 sata nakon operativnog zahvata, skupine 6 i 7 (koje su intraperitonealno primile BPC 157) primjećeno je u prvoj minuti nakon aplikacije povećanje snage donjih ekstremiteta mjereno indeksom motorne funkcije, u odnosu na skupinu 9 koja je primila fiziološku otopinu (Sl. 10).

Slika 10. MFI vrijednost u prvoj minuti za skupine 6,7 i 9 nakon 24 sata lokalno primjenjenog BPC 157 i F



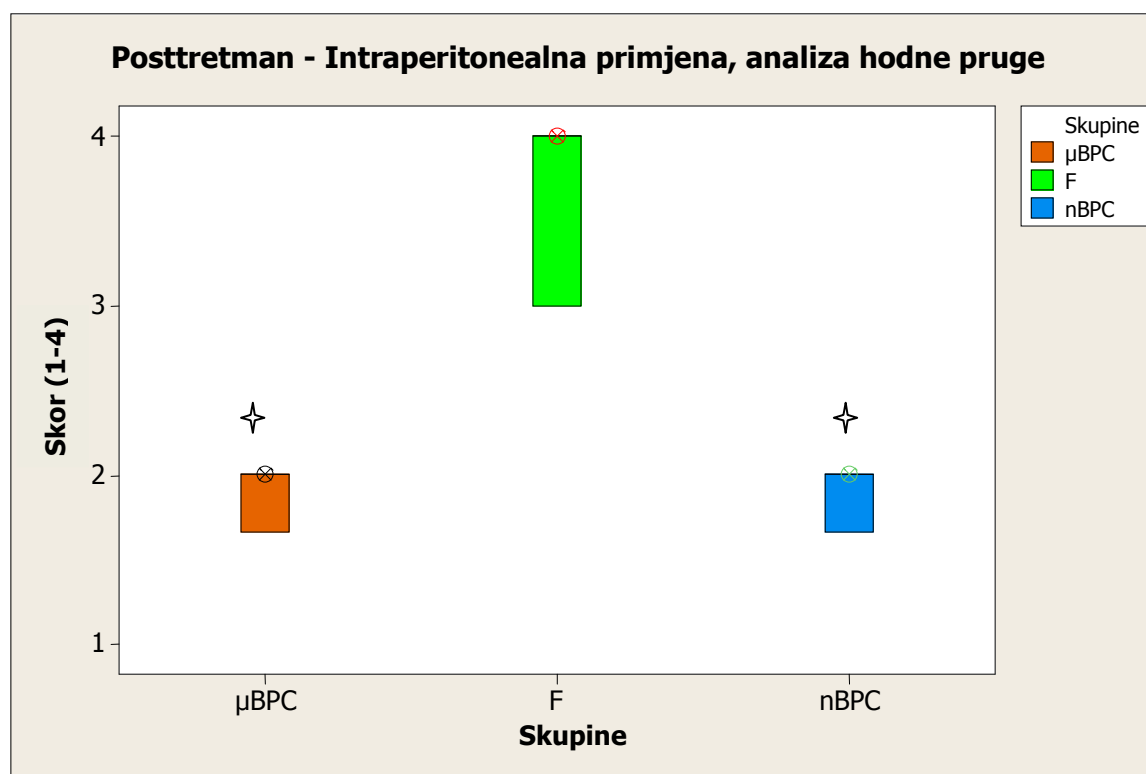
U istim skupinama je MFI mjeren i 3 minute nakon aplikacije, kada je u skupinama 6 i 7 (koje su intraperitonealno primile BPC 157) dosegao vrijednost poput one izmjerene prije operativnog zahvata, u odnosu na skupinu 9 koja nije pokazala nikakvo poboljšanje snage donjih ekstremiteta (Sl. 11).

Slika 11. MFI vrijednost u trećoj minuti za skupine 6,7 i 9 nakon 24 sata lokalno primjenjenog BPC 157 i F



Analizom hodne pruge uočeno je da u skupinama 6 i 7 (koje su dobile intraperitonealno BPC 157 24 sata nakon operacije) nije nastupilo pogoršanje kvalitete hoda, za razliku od skupine 9 koja je dobila intraperitonealno fiziološku otopinu 24 sata nakon operacije, kod koje je primjećeno pogoršanje kvalitete hoda (Sl. 12).

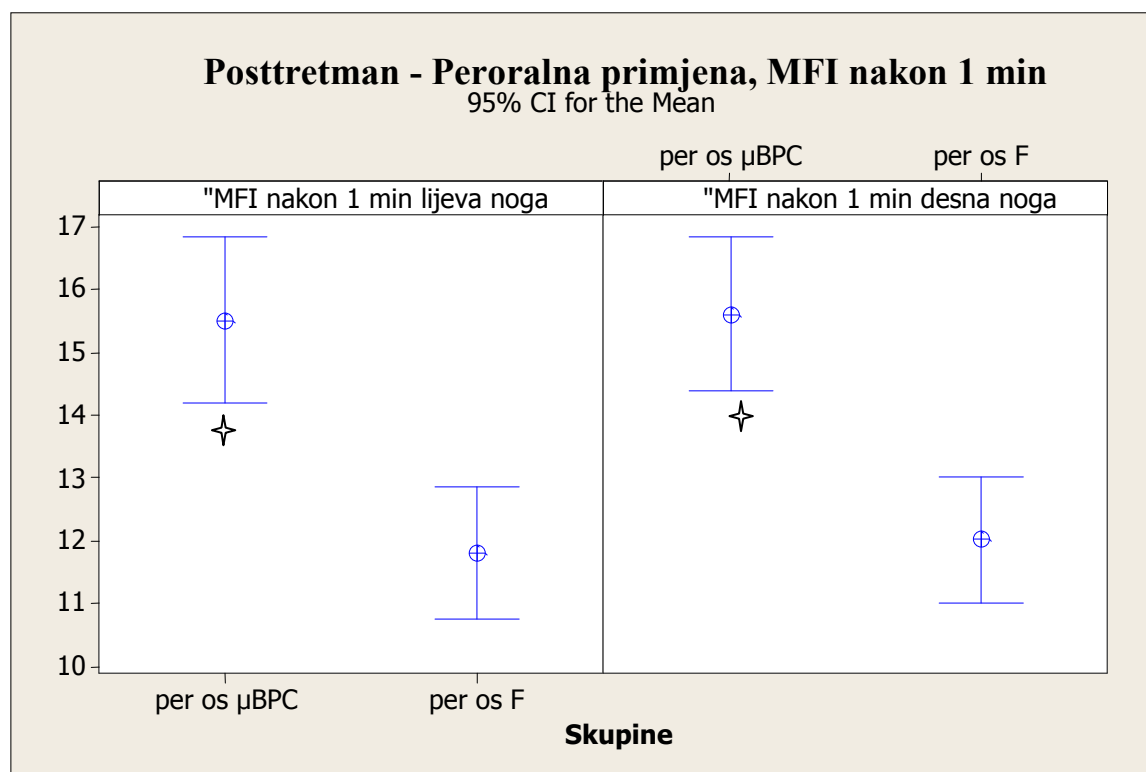
Slika 12. Analiza hodne pruge za skupine 6, 7 i 9 nakon 24 sata lokalno primjenjenog BPC 157 i F



Mjerenjem MFI nakon peroralne primjene u posttretmanu (24 sata nakon operativnog zahvata), skupina 8 koja je primila peroralno BPC 157

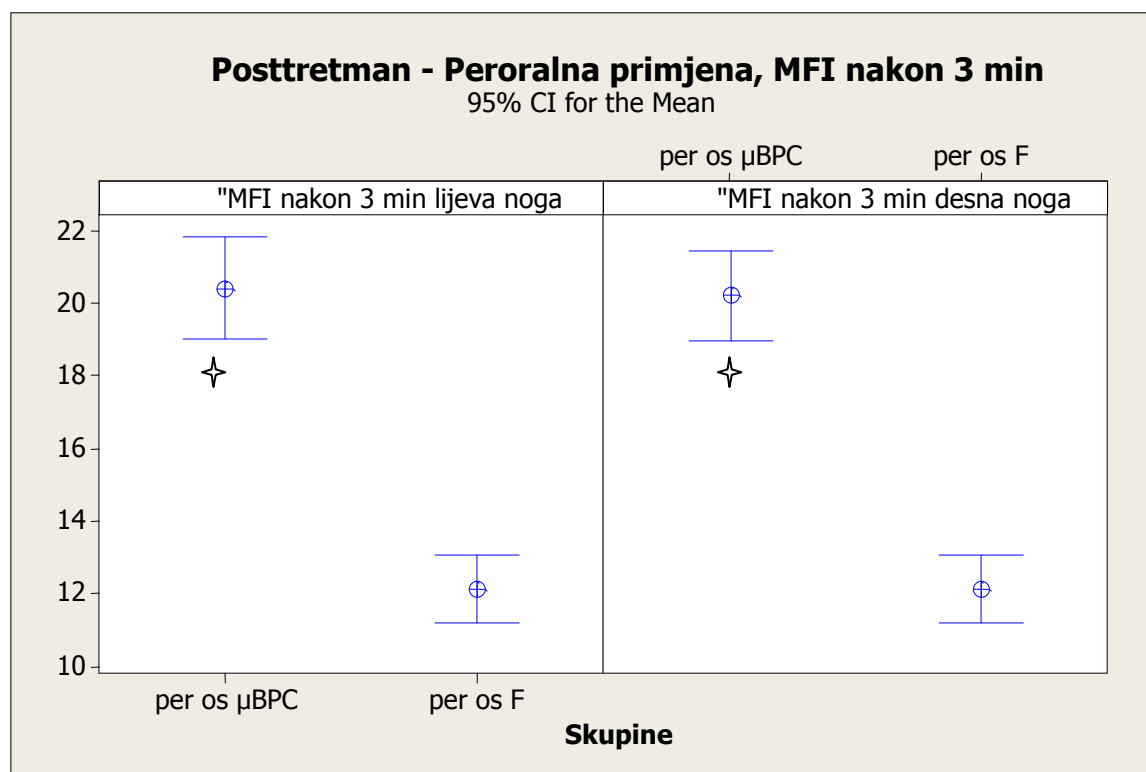
primjećeno je u prvoj minuti nakon aplikacije povećanje snage donjih ekstremiteta mjereno indeksom motorne funkcije, u odnosu na skupinu 10 koja je primila fiziološku otopinu (Sl. 13).

Slika 13. MFI vrijednost u prvoj minuti za skupine 8 i 10 nakon peroralno primjenjenog BPC 157 i F



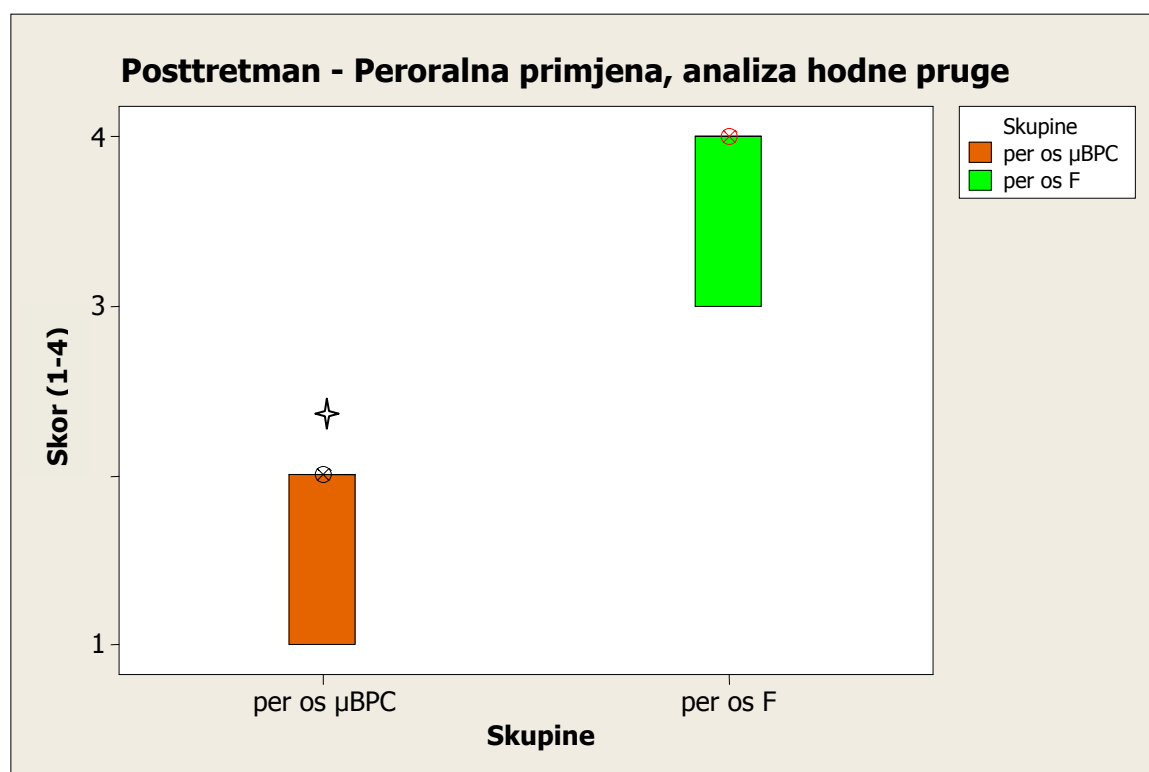
U istim skupinama je MFI mjeren i 3 minute nakon aplikacije, kada je u skupini 8 (koja je peroralno primila BPC 157) dosegao vrijednost poput one izmjerene prije operativnog zahvata, u odnosu na skupinu 10 koja nije pokazala nikakvo poboljšanje snage donjih ekstremiteta (Sl. 14).

Slika 14. MFI vrijednost u trećoj minuti za skupine 8 i 10 nakon peroralno primjenjenog BPC 157 i F



Analizom hodne pruge uočeno je da u skupini 8 (koja je dobila peroralno BPC 157 24 sata nakon operacije) nije nastupilo pogoršanje kvalitete hoda, za razliku od skupine 10 koja je dobila peroralno fiziološku otopinu 24 sata nakon operacije, kod koje je primjećeno pogoršanje kvalitete hoda (Sl. 15).

Slika 15. Analiza hodne pruge za skupine 8 i 10 nakon peroralno primjenjenog BPC 157 i F



5.2 PHD

Histološka i morfometrijska analiza životinja u kojih je učinjena anastomoza aorte u kotretmanu pokazala je značajno manju okluziju aortalnog lumena trombom (skupine 1, 2 i 3), sa srednjom vrijednošću od 23,36% (raspon 8,40- 35,52), u usporedbi sa vrijednostima kontrolnim skupinama (skupine 4 i 5) gdje je srednja vrijednost iznosila 37,43% (26-59,78). U kontrolnim skupinama bio je više izražen edem u stijenci krvne žile.

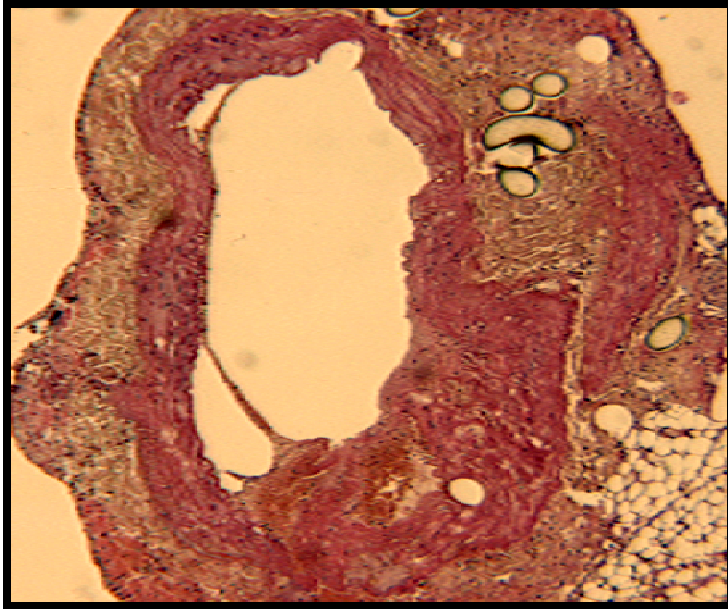
U posttretmanu, kada je BPC 157 odnosno fiziološka otopina primjenjena nakon 24 sata, u trenutku žrtvovanja, tri minute nakon primjenjenog BPC 157, kod skupina 6, 7 i 8 nije bilo vidljive aortalne opstrukcije trombom, a u lumenu su nađeni samo eritrociti. U kontrolnim je skupinama (skupine 9 i 10) lumen opstruiran manjim ili većim trombom (Tabl. 2).

Tablica 2. Usporedba postotaka začepljenosti lumena trombom između ispitivanih skupina. *
 $p < 0.05$

Postotak začepljenosti lumena trombom (%)			
Kotretman		Lokalna primjena	Peroralna primjena
	Kontrola	37.5±7.3	38.3±6.7
	BPC 157 μg	23.5±4.1*	24.3±4.9*
	BPC 157 ng	26.5±5.1*	27.7±5.5*
Posttretman		Intraperitonealna primjena	Peroralna primjena
	Kontrola	40.3±8.2	41.6±7.7
	BPC 157 μg	24.7±6.6*	22.6±9.9*

Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u životinja koje su primile BPC 157 bilo da se radilo o μg ili ng dozi lijeka, odnosno bez obzira je li preparat primjenjen lokalno ili peroralno. Sve životinje koje su primile BPC 157 u preparatu aorte su imale značajno reducirani ugrušak koji je obuhvaćao samo 23.5- 26.5 % lumena (Sl. 16), a u nekim preparatima u posttretmanu primjećen je i potpuni nedostatak ugruška i prisustvo eritrocita u lumenu (Sl. 17). U odnosu na eksperimentalne životinje, kontrolne skupine su imale statistički značajno veći ugrušak na mjestu anastomoze koji je zatvarao 37,5-41,6 % lumena (Sl. 18).

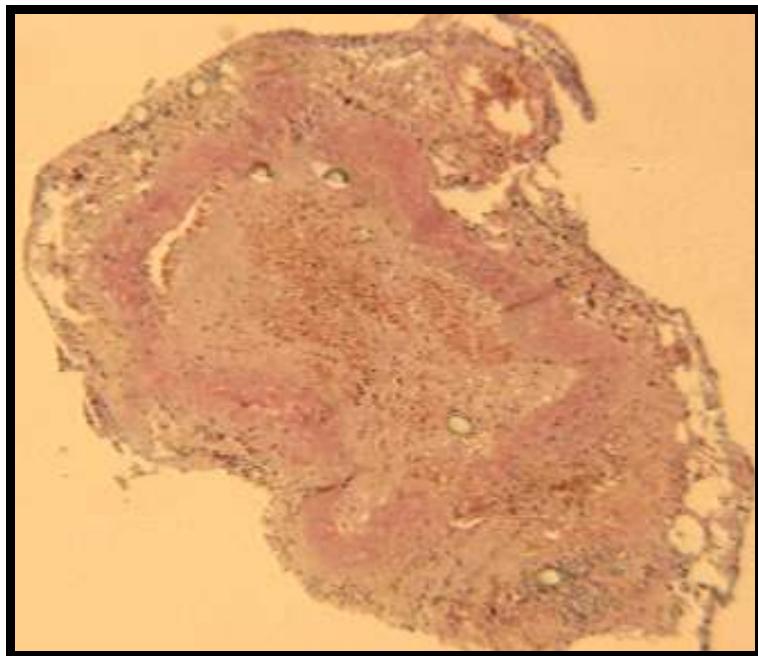
Slika 16. Transverzalni rez kroz aortu (hemalaun-eozin, dvostruko povećanje) Reduciran ugrušak u životinja koje su primale BPC 157 lokalno nakon anastomoze



Slika 17. Transverzalni rez kroz aortu (HE, x2). Prisutnost eritrocita na mjestu anastomoze u nekih životinja koje su primale BPC 157 intraperitonealno 24 sata nakon operacije



Slika 18. Transverzalni rez kroz aortu (HE, x2) Ugrušak na mjestu anastomoze u životinja koje su lokalno primale fiziološku otopinu



6. *RASPRAVA*

Osvrt na rezultate provedenog istraživanja

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju postavljenu hipotezu i pokazuju da primjena pentadekapeptida BPC 157, parenteralna i peroralna, zaista poboljšava cijeljenje aortalne anastomoze u štakora te utječe na nastajanje ugruška. To je vidljivo kako iz rezultata praćenja kliničko-funkcionalnih pokazatelja, tako i iz rezultata analize histoloških preparata. Usporedbe skupina pokazale su da se eksperimentalne skupine, tj. one koje su dobivale pentadekapeptid BPC 157 lokalno odmah po učinjenoj anastomozi (skupine 1 i 2), odnosno one koje su isti preparat dobile per os (skupina 4), statistički značajno razlikuju od kontrolnih skupina (skupine 3 i 5) u oba promatrana parametra funkcionalnog oporavka (Sl. 5 i Sl. 8). Naime, u skupinama 3 i 5, tj. u skupinama koje nisu dobivale pentadekapeptid BPC 157, razvio se nakon kirurškog zahvata ugrušak na mjestu anastomoze koji je značajno ugrozio funkcionalnost stražnjih ekstremiteta.

Nakon učinjene aortalne anastomoze i primjenjenog BPC 157 lokalno, nađeno je da je utjecao na smanjenje ugruška u području anastomoze. Učinak je bio isti bez obzira je li primjenjena mikrogramska ili nanogramska koncentracija preparata. To je važno jer je u kontrolnim skupinama pokazano da je aorta nakon zahvata opstruirana ugruškom u više od trećine lumena, što je značajno utjecalo na hod koji je bio usporen i nepravilan uz bolne senzacije i slabost mišića. Isti je učinak primjećen i kada je apliciran intraperitonealno i peroralno 24 sata nakon učinjenog anastomotskog zahvata. Apliciran nakon 24 sata, unutar tri minute nakon aplikacije, rapidno se oporavila funkcija donjih ekstremiteta kao i mišićna funkcija. Patohistološka analiza tih odsječaka aorte pokazala je da se u aortalnom lumenu nije našao ugrušak.

Nalaz da BPC 157 može poboljšati ishod cijeljenja anastomoze aorte u štakora, kao i potencijalno drugih ozljeda krvnih žila, pretpostavljen je analizom inicijalnih studija o

njegovom citoprotektivnom učinku, posebno sposobnosti da izazove jak citoprotektivni učinak. Naime, poveznica je logički objašnjiva zbog činjenice da u želucu citoprotekcija održava integritet endotela, prepoznaje njegovu ozljedu prije nego nastupi oštećenje mukoze, a BPC 157 je pokazao značajnu ulogu u protekciji endotela u alkoholom inducirane ozljede želučane sluznice. Osim toga, koristan učinak BPC 157-a je dokazan i u istraživanju kod ishemije donjih ekstremiteta i prolongirane koarktacije, kao i kod lezije drugih organa (slezena, bubreg, kost..) koje su nastupile nakon opstrukcije većih krvnih žila (Sikiric i sur., 2011).

Zanimljivo je da BPC 157 nije utjecao na parametar koagulacije kao takve, nego skraćanjem vremena krvarenja odnosno produljenog krvarenja koje bi inače nastupilo nakon primjene heparina ili aspirina.

Uzevši u obzir učinak BPC 157 na cijeljenje rane i krvarenje, konstantno se nalaze novi dokazi o njegovom utjecaju na parametre ranog cijeljenja (*Brcic i sur., 2009*) kože, crijeva, mišića, tetiva, ligamenata i krvnih žila (*Sikiric i sur., 2010; Hrelec i sur., 2009; Sikiric i sur., 2003; Tkalcević i sur., 2007; Brcic i sur., 2009; Sikiric i sur., 2006; Seiwerth i sur., 1997; Mikus i sur., 2001; Staresinic i sur., 2006; Staresinic i sur., 2003; Cerovecki i sur., 2010; Vuksic i sur., 2007; Sever i sur., 2009*). Njegova interferencija s najranijim elementima cijeljenja – učinak na grupiranje trombocita vezanjem na eksponirani kolagen, lako je objašnjiva ako uzmemo u obzir njegov učinak na cijeljenje kao kombinaciju stimulacije kolagena (*Sikiric i sur., 2003; Tkalcević i sur., 2007; Mikus i sur., 2001; Staresinic i sur., 2006; Staresinic i sur., 2003; Cerovecki i sur., 2010*) i ekspresiju *egr-1* gena, koji je također odgovoran za generaciju citokina i faktora rasta, pa tako i za rano formiranje ekstracelularnog matriksa (*Tkalcević i sur., 2007*). Važno je naglasiti da osim što stimulira ekspresiju *egr-1* gena, BPC 157 također stimulira ekspresiju *nab-2* (*egr-1* repressor nerve growth factor 1-A

binding protein-2) (*Tkalcević i sur., 2007*), povratni mehanizam koji nadzire i regulira egr-1 posredovanu transkripciju gena.

BPC 157 bi mogao imati i dodatni utjecaj na trombocite uzevši u obzir njegov efekt na centralno otpuštanje serotonina (*Tohyama i sur., 2004*), a trombociti su glavni izvor perifernog serotonina (*Vanhoutte i Lüscher, 1986; Barradas i Mikhailidis, 1992*). Uz to, BPC 157 ima angiogeni efekt (*Brcic i sur., 2009; Sikiric i sur., 2006; Sikiric i sur., 1999; Seiwerth i sur., 1997; Mikus i sur., 2001; Staresinic i sur., 2006; Staresinic i sur., 2003; Cerovecki i sur., 2010*), održava integritet endotela (*Sikiric i sur., 2010; Hrelec i sur., 2009; Sikiric i sur., 1994*), utječe na porast endotelina u serumu što štiti endotel kao i efekt na NO sustav (*Sikirić i sur., 1997; Balenovic i sur., 2009; Lovric-Bencic i sur., 2004*). Ovo bi moglo biti značajno zato što disfunkcija endotela može dovesti do niske razine NO, a BPC 157 korelira i s NO prekursorom i NOS-blokerom (*Sikirić i sur., 1997; Balenovic i sur., 2009; Lovric-Bencic i sur., 2004*). Također je poznato da hipoksična ozljeda endotela aktivira elk-1/egr-1 kaskadu, što dovodi do nakupljanja leukocita i trombicita te potencijalno stvaranja ugruška (*Malone i Agutter, 2009*).

Osim utjecaja na aspirinom induciran krvareći želučani ulkus u štakora (*Sikiric i sur., 1997*), BPC 157 također utječe na NSAID toksičnost, želučani i ulukse tankog crijeva (izazvane indometacinom, diklofenakom i ibuprofenom (*Ilic i sur., 2011; Sikiric i sur., 1997*), hepatotoksičnost (paracetamol, diclofenac, ibuprofen- *Ilic i sur., 2010; Ilic i sur., 2011; Ilic i sur., 2011*) i encefalopatiju (paracetamol, diclofenac, ibuprofen). Tako je moguće i da BPC 157 antagonizira i NSAID efekt na produženje krvarenja i trombocite.

U zaključku, opravdana je pretpostavka da utjecajem na poremećaje krvarenja utječemo na razvoj tromboze i obratno (*Tohyama i sur., 2004*). S druge strane, proces cijeljenja rane zaslužan je za sva 4 događaja koja slijede ozljedu endotela (vaskularnu konstrikciju, rahli trombocitni čep, fibrinsku mrežicu koja osigurava stabilnost čepa i disoluciju tromba), tako da

preparat poput BPC 157 koji je uspješan u cjeljenju rane, a i u poremećajima krvarenja (*Sikiric i sur., 2010; Hrelec i sur., 2009; Sikiric i sur., 2003; Tkalcević i sur., 2007; Brcic i sur., 2009; Sikiric i sur., 2006; Seiwerth i sur., 2001; Staresinic i sur., 2006; Staresinic i sur., 2003; Cerovecki i sur., 2010; Vuksic i sur., 2007; Sever i sur., 2009*) predstavlja veliku teoretsku i praktičnu važnost. Svi nabrojeni efekti imaju praktičnu važnost i zato jer je utjecaj BPC 157 (uzimajući u obzir dozu, te put primjene- intravenski, intraperitonealni, intragastrički) sličan primjeni aspirina, varfarina i heparina, s naglaskom na činjenicu da produžuje vrijeme preživljenja ispitivanih životinja.

BPC 157 ima dokazano siguran profil u toksikološkim studijama i bez nuspojava u kliničkim pokusima, što ga čini pogodnim u širokoj kliničkoj primjeni.

7. **ZAKLJUČCI**

- BPC 157 smanjuje stvaranje tromba.
- BPC 157 dovodi do uklanjanja već stvorenog tromba
- Učinak BPC 157 na smanjivanje stvaranja tromba, odnosno uklanjanje formiranog tromba, korelira s održavanjem, odnosno ponovnim uspostavljanjem funkcije donjih ekstremiteta.
- Učinak BPC 157 se javlja prilikom primjene μg i ng doza.
- Učinak BPC 157 se javlja i kod lokalne primjene, te se može govoriti o lokalnom učinku.
- Učinak BPC 157 se javlja i kod sistemne (intraperitonealne, odnosno peroralne) primjene.
- Učinak na anastomozi abdominalne aorte dobiven je s istim dozama koje su prije uspješno korištene kod drugih različitih modela različitih tkivnih oštećenja te se pripisuje citoprotektivnom učinku peptida, odnosno njegovom djelovanju na integritet endotela.
- Ovi rezultati predstavljaju dobru osnovu za daljnje izučavanje učinka BPC 157, te njegovu moguću primjenu u terapiji.

8. SAŽETAK

Tromboze velikih krvnih žila tipično su predmet najbrojnijih istraživanja zbog velikom kliničkog i ekonomskog efekta, no tromboza zahvaća i mikrocirkulaciju. Mikrovaskularni trombi dokazani su u mnoštvu bolesti i stanja kao što su trombocitopenična purpura, sepsa, DIK i sl. Važnost tromboze i mogućnosti njenog spriječavanja predstavlja važan medicinski i ekonomski cilj. U ovom smo radu bili fokusirani na učinak pentadekapeptida BPC 157, u kojeg je već dokazano citoprotektivno djelovanje, na stvaranje ugruška u krvnoj žili kojoj je endotel oštećen uslijed operativnog zahvata. Abdominalna aorta transecirana je u području između bubrežnih i ilijačnih arterija, te ponovno anastomozirana Prolen 8/0 ili 9/0 pojedinačnim šavima. Obradeno je ukupno 100 životinja, od kojih je polovica primila BPC 157 odnosno fiziološku otopinu (kontrolne skupine) odmah nakon zahvata, a druga polovica isto nakon 24 sata. Svim skupinama mjerena je motorna snaga stražnjih ekstremiteta prije i nakon zahvata, te je analizirana kvaliteta hoda tzv. testom analize hodne pruge. U svih je skupina 24 sata nakon zahvata, po žrtvovanju, uzet tretirani odsječak aorte koji je patohistološki analiziran.

Sve skupine koje su primile BPC 157, bilo da se radilo o mikrogramskoj ili nanogramskoj koncentraciji, odnosno lokalnoj ili peroralnoj primjeni pokazale su da njegov učinak u smislu nepostojanja ugruška na mjestu anastomoze. Navedeno se pozitivno odrazilo i u funkcionalnim testovima mišićne snage stražnjih ekstremiteta i analizi hodne pruge, gdje je uočeno da operativni zahvat nije utjecao na kvalitetu protoka u distalnoj aorti što je rezultiralo urednim hodom i jednakom snagom potiska stražnjih ekstremiteta kao i prije zahvata. U patohistološkoj analizi uočeno je da na u anastomoziranom dijelu aorte nije bio prisutan ugrušak. Sve navedeno statistički je značajno bilo različito u kontrolnim skupinama. Naime, u navedenima je analiza hodne pruge pokazala značajno pogoršanje hoda, u testu snage

stražnjih ekstremiteta test je dao lošije rezultate nego prije zahvata, a na patohistologiji je operirani dio aorte bio većim dijelom zatvoren trombom.

Ovim radom pokazan je visoka učinkovitost BPC 157 u sprječavanju nastanka ugruška na mjestu oštećenja endotela (transekcija i anastomoza), a poglavito njegov učinak na već postojeći ugrušak nakon operativnog zahvata u životinja u kojih je primjenjen 24 sata nakon operacije.

9. *SUMMARY*

EFFECT OF PENTADECAPEPTIDE BPC 157 ON CLOT FORMATION AT AORTAL ANASTOMOSIS IN RATS

Diseases that are the result of large vessels thrombosis are a subject of numerous scientific research programmes because of their clinical and economic aspect, but the thrombosis also happens in microcirculation. Microvascular thrombi are found in number of diseases and conditions like thrombocytopenic plethora, sepsis, disseminated intravascular coagulation etc. The significance of thrombosis and the importance of its prevention represent an important medical and economic goal.

In this paper, we focused on impact of BPC 157 (in which we already proved citoprotective effect) on clot formation at the site of microvascular endothel injury cause by operation. Abdominal aorta was transected between renal and illiac arteries, and then anastomosed with Prolen 8/0 or 9/0 sutures. We operated a 100 animals, of which 50 received BPC 157 or saline right after the procedure, and the other half the same but after 24 hours. All the groups were measured the lower extremities strength, before and after procedure, and we did the walk analysis with the specific test. Histology specimens were harvested from all animals 24 hours after the surgery.

All groups of animals that received BPC 157, weather it was microgram or nanogram concentration, or whether it was administered locally or by mouth, showed that there was no lot present in the histological aorta specimens. That result was also confirmed in functional test and walk analysis, where we noticed that the strength of the lower extremities was not impaired, compared to the values taken before the operation.

On the other hand, control groups had statistically significantly different results. The ability to walk and lower extremities strength was significantly diminished after the surgery, and on histology specimens there was a clot in the aortal lumen.

We showed that BPC 157 has a strong effect on clot prevention, when there is an endothel injury (transection and anastomosis), but most importantly his effect on already formed clot in animals who received BPC 157 24 hours after surgery.

10. LITERATURA

1. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:1078-87.
2. Balenovic D, Bencic ML, Udovicic M, Simonji K, Hanzevacki JS, Barisic I, Kranjcevic S, Prkacin I, Coric V, Brcic L, Coric M, Brcic I, Borovic S, Radic B, Drmic D, Vrcic H, Seiwert S, Sikiric P. Inhibition of methyldigoxin-induced arrhythmias by pentadecapeptide BPC 157: a relation with NO-system. *Regul Pept* 2009; 156: 83-89.
3. Barradas MA, and Mikhailidis DP. Serotonin, histamine and platelets in vascular disease with special reference to peripheral vascular disease. *Braz J Med Biol Res* 1992; 25:1063-76.
4. Beck EA. The treatment of thrombosis. In: Parnham MJ, Bruinvels J, editors. *Discoveries in pharmacology, Volume 2: Haemodynamics, hormones & inflammation*. Amsterdam-New York-Oxford: Elsevier Science Publisher BV; 1984, p 127-139.
5. Brcic L, Brcic I, Staresinic M, Novinscak T, Sikiric P, Seiwert S. Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60:191-6.
6. Brzozowski T, Konturek PC, Pajdo R, Ptak-Belowska A, Kwiecien S, Pawlik M, Drozdowicz D, Sliwowski Z, Brzozowski B, Konturek SJ, Pawlik WW. Physiological mediators in nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)-induced impairment of gastric mucosal defense and adaptation. Focus on nitric oxide and lipoxins. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59(Suppl 2): 89-102.
7. Cerovecki T, Bojanic I, Brcic L, Radic B, Vukoja I, Seiwert S, Sikiric P. Pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736) improves ligament healing in the rat. *J Orthop Res* 2010; 28:1155-61.

8. Collier J, Vallance P. Physiological importance of nitric oxide. *BMJ*. 1991 Jun 1;302(6788):1289-90
9. Gjurasin M, Miklic P, Zupancic B, Perovic D, Zarkovic K, Brcic L, Kolenc D, Radic B, Seiwerth S, Sikiric P. Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. *Regul Pept* 2009; 160: 33-41.
10. Guyton AC, Hall JE, Medicinska naklada, Zagreb, 1999
11. Haraguchi T, Okada K, Tabata Y, Maniwa Y, Hayashi Y, Okita Y. Controlled release of basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogel sheet improves structural and physiological properties of vein graft in rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 548-555.
12. Hiebert LM, Wice SM, McDuffie NM, Jaques LB. The heparin target organ- the endothelium. Studies in a rat model. *Q J Med* 1993; 86:341-8.
13. Hrelec M, Klicek R, Brcic L, Brcic I, Cvjetko I, Seiwerth S, Sikiric P. Abdominal aorta anastomosis in rats and stable gastric pentadecapeptide BPC 157, prophylaxis and therapy. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 7:161-5.
14. Ilic S, Drmic D, Franjic S, Kolenc D, Coric M, Brcic L, Klicek R, Radic B, Sever M, Djuzel V, Filipovic M, Djakovic Z, Stambolija V, Blagaic AB, Zoricic I, Gjurasin M, Stupnisek M, Romic Z, Zarkovic K, Dzidic S, Seiwerth S, Sikiric P. Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. *Life Sci* 2011; 88:535-42.
15. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, Kolenc D, Brcic L, Radic B, Djuzel V, Boban Blagaic A, Romic Z, Dzidic S, Kalogjera L, Seiwerth S, Sikiric P. Ibuprofen hepatic encephalopathy, hepatomegaly, gastric lesion and gastric pentadecapeptide BPC 157 in rats. *Eur J Pharmacol* 2011 (epub ahead of print).

16. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, Kolenc D, Coric M, Brcic L, Kliceck R, Radic B, Sever M, Djuzel V, Ivica M, Boban Blagaic A, Zoricic Z, Anic T, Zoricic I, Djidic S, Romic Z, Seiwerth S, Sikiric P. High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736). *J Physiol Pharmacol* 2010;61:241-50.
17. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO, Osnove histologije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
18. Kliceck R, Sever M, Radic B, Drmic D, Kocman I, Zoricic I, Vuksic T, Ivica M, Barisic I, Ilic S, Berkopic L, Vrcic H, Brcic L, Blagaic AB, Coric M, Brcic I, Rokotov DS, Anic T, Seiwerth S, Sikiric P. Pentadecapeptide BPC 157, in clinical trials as a therapy for inflammatory bowel disease (PL14736), is effective in the healing of colocutaneous fistulas in rats: role of the nitric oxide-system. *J Pharmacol Sci* 2008; 108: 7-17.
19. Kuhan G, Raptis S. Trash foot following operations involving the abdominal aorta. *Aust NZJ Surg* 1997; 67: 21-24.
20. Kwiecien S, Pawlik MW, Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, Pawlik WW, Konturek SJ. Nitric oxide (NO)-releasing aspirin and (NO) donors in protection of gastric mucosa against stress. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59(Suppl 2): 103-115.
21. Lovric-Bencic M, Sikiric P, Hanzevacki JS, Seiwerth S, Rogic D, Kusec V, Aralica G, Konjevoda P, Batelja L, Blagaic AB. Doxorubicine-congestive heart failure-increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan, and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. *J Pharmacol Sci* 2004; 95:19-26
22. Malone PC, Agutter PS. To what extent might deep venous thrombosis and chronic venous insufficiency share a common etiology? *Int Angiol* 2009; 28:254-68.
23. Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch* 2010; 459:807-16.

24. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S, Petricevic A, Aralica G, Druzijancic N, Rucman R, Petek M, Pigac B, Perovic D, Kolombo M, Kokic N, Mikus S, Duplancic B, Fattorini I, Turkovic B, Rotkvic I, Mise S, Prkacin I, Konjevoda P, Stambuk N, Anic T. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns* 2001;27:817-27.
25. Norton AJ, Bollinger RR, Chang AE, Lowry SF, Mulvihill SJ, Pass HI, Thompson RW. *Surgery: Basic Science and Clinical Evidence*, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg 2000.
26. Novinscak T, Brcic L, Staresinic M, Jukic I, Radic B, Pevec D, Mise S, Tomasovic S, Brcic I, Banic T, Jakir A, Buljat G, Anic T, Zoricic I, Romc Z, Seiwerth S, Sikiric P. Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg Today* 2008; 38: 716-725.
27. Robert A. Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 1979; 77: 761-767.
28. Ruenzi M, Stolte M, Veljaca M, Oreskovic K, Peterson J. Ulcerative Colitis Study Group. A multicenter, randomized, double blind, placebo-controlled phase II study of PL14736 enema in the treatment of mild-to-moderate ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2005; 128: A584.
29. Rumbaut RE, Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis Perumal Thiagarajan. *Synthesis Lectures on Integrated Systems Physiology—From Molecules to Function*. Naklada Morgan&Claypool 2010.
30. Sako H, Hadama T, Miyamoto S, Anai H, Wada T, Iwata E, Hamamoto H, Tanaka H, Urushino K, Shuto T. Effect of prostaglandin E1 on ischemia-reperfusion injury during abdominal aortic aneurysm surgery. *Surg Today* 2006; 36: 140-146.
31. Seiwerth S, Sikiric P, Grabarevic Z, Zoricic I, Hanzevacki M, Ljubanovic D, Coric V, Konjevoda P, Petek M, Rucman R, Turkovic B, Perovic D, Mikus D, Jandrijevic S,

Medvidovic M, Tadic T, Romac B, Kos J, Peric J, Kolega Z. BPC 157's effect on healing. *J Physiol Paris*. 1997;91:173-8.

32. Sever M, Klicek R, Radic B, Brcic L, Zoricic I, Drmic D, Ivica M, Barisic I, Ilic S, Berkopic L, Blagaic AB, Coric M, Kolenc D, Vrcic H, Anic T, Seiwerth S, Sikiric P. Gastric pentadecapeptide BPC 157 and short bowel syndrome in rats. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2070-2083.

33. Sikirić P, Petek M, Rucman R, Seiwerth S, Grabarević Z, Rotkvić I, Turković B, Jagić V, Mildner B, Duvnjak M. A new gastric juice peptide, BPC 157. An overview of the stomach-stress-organoprotection hypothesis and beneficial effects of BPC 157. *J Physiol (Paris)* 1993; 87: 313-327.

34. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Blagaic AB, Zoricic I, Sever M, Klicek R, Radic B, Keller N, Sipos K, Jakir A, Udovicic M, Tonkic A, Kokic N, Turkovic B, Mise S, Anic T. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL 14736, Pliva, Croatia). Full and distended stomach and vascular response. *Inflammopharmacology* 2006;14:214-21.

35. Sikiric P, Seiwerth S, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, Drmic D, Ilic S, Kolenc D. Revised Robert's cytoprotection and adaptive cytoprotection and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Possible significance and implications for novel mediator. *Curr Pharm Des* 2010;16:1224-34.

36. Sikirić P, Seiwerth S, Desković S, Grabarević Z, Marović A, Rucman R, Petek M, Konjevoda P, Jadrijević S, Sosa T, Perović D, Aralica G, Turković B. New model of cytoprotection/adaptive cytoprotection in rats: endogenous small irritants, antiulcer agents and indomethacin. *Eur J Pharmacol* 1999; 364: 23-31.

37. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Petek M, Rucman R, Turkovic B, Rotkvic I, Jagic V, Duvnjak M, Mise S. The beneficial effect of BPC 157, a 15 amino acid peptide BPC

fragment, on gastric and duodenal lesions induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H₂ receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci* 1994; 54:PL63-8.

38. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, Turkovic B, Rotkvic I, Mise S, Zoricic I, Konjevoda P, Perovic D, Simicevic V, Separovic J, Hanzevacki M, Ljubanovic D, Artukovic B, Bratulic M, Tisljar M, Rekic B, Gjurasin M, Miklic P, Buljat G. Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both non-steroidal anti-inflammatory agent-induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. *J Physiol Paris* 1997;91:113-22.

39. Sikiric P, Seiwerth S, Mise S, Staresinic M, Bedekovic V, Zarkovic N, Borovic S, Gjurasin M, Boban-Blagaic A, Batelja L, Rucman R, Anic T. Corticosteroid-impairment of healing and gastric pentadecapeptide BPC-157 creams in burned mice. *Burns*. 2003;29:323-34.

40. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V, Turković B, Rotkvic I, Mise S, Zoricic I, Konjevoda P, Perovic D, Jurina L, Separovic J, Hanzevacki M, Artukovic B, Bratulić M, Tisljar M, Gjurasin M, Miklić P, Stancic-Rokotov D, Slobodnjak Z, Jelovac N, Marovic A. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *Eur J Pharmacol* 1997; 332: 23-33.

41. Sikiric P, Separovic J, Anic T, Buljat G, Mikus D, Seiwerth S, Grabarevic Z, Stancic-Rokotov D, Pigac B, Hanzevacki M, Marovic A, Rucman R, Petek M, Zoricic I, Ziger T, Aralica G, Konjevoda P, Prkacin I, Gjurasin M, Miklic P, Artukovic B, Tisljar M, Bratulic M, Mise S, Rotkvic I. The effect of pentadecapeptide BPC 157, H₂-blockers, omeprazole and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. *J Physiol Paris* 1999; 93:479-85.

42. Sikiric P, Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, Rokotov DS, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, Drmic D, Ilic S, Kolenc D, Vrcic H, Sebecic B. Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157: Novel Therapy in Gastrointestinal Tract. *Curr Pharm Des*. 2011 May 6 (epub ahead of print)
43. Skorjanec S, Dolovski Z, Kocman I, Brcic L, Blagaic Boban A, Batelja L, Coric M, Sever M, Klicek R, Berkopic L, Radic B, Drmic D, Kolenc D, Ilic S, Cesarec V, Tonkic A, Zoricic I, Mise S, Staresinic M, Ivica M, Lovric Bencic M, Anic T, Seiwerth S, Sikiric P. Therapy for unhealed gastrocutaneous fistulas in rats as a model for analogous healing of persistent skin wounds and persistent gastric ulcers: stable gastric pentadecapeptide BPC 157, atropine, ranitidine, and omeprazole. *Dig Dis Sci* 2009; 54:46-56.
44. Staresinic M, Petrovic I, Novinscak T, Jukic I, Pevec D, Suknaic S, Kokic N, Batelja L, Brcic L, Boban-Blagaic A, Zoric Z, Ivanovic D, Ajduk M, Sebecic B, Patrlj L, Sosa T, Buljat G, Anic T, Seiwerth S, Sikiric P. Effective therapy of transected quadriceps muscle in rat: Gastric pentadecapeptide BPC 157. *J Orthop Res* 2006;24:1109-17.
45. Staresinic M, Sebecic B, Patrlj L, Jadrijevic S, Suknaic S, Perovic D, Aralica G, Zarkovic N, Borovic S, Srdjak M, Hajdarevic K, Kopljar M, Batelja L, Boban-Blagaic A, Turcic I, Anic T, Seiwerth S, Sikiric P. Gastric pentadecapeptide BPC 157 accelerates healing of transected rat Achilles tendon and in vitro stimulates tendocytes growth. *J Orthop Res* 2003;21:976-83.
46. Szabo S, Trier JS, Brown A, Schnoor J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 1985; 88: 228-236.
47. Sosa T, Sutlic Z, Stanec Z, Tonković I. KIRURGIJA. Naklada Ljevak d.o.o. Zagreb, 2007.

48. Tkalcević VI, Cuzic S, Brajsa K, Mildner B, Bokulic A, Situm K, Perovic D, Glojnaric I, Parnham MJ. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *Eur J Pharmacol* 2007; 570: 212-221.
49. Tohyama Y, Sikiric P, Diksic M. Effects of pentadecapeptide BPC157 on regional serotonin synthesis in the rat brain: alpha-methyl-L-tryptophan autoradiographic measurements. *Life Sci* 2004;76:345-57.
50. Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. Sabiston Textbook of surgery. The Biological Basis of Modern Surgical Practice. 18th edition. Saunders Elsevier, 2008.
51. Vanhoutte PM, Lüscher TF. Serotonin and the blood vessel wall. *J Hypertens Suppl* 1986; 4:29-35.
52. Veljaca M, Chan K, Guglietta A. Digestion of h-EGF, h-TGF alpha and BPC 157 in human gastric juice. *Gastroenterology* 1995; 108: 761.
53. Veljaca M, Pavić-Sladoljev D, Mildner B, Brajsa K, Krnić Z, Bubenik M, Stipanovic S, Tabak-Slosic M, Brnic L, Khan Z, Krznarić Z, Bischoff A, Scroeder A, van Dongen WD, van Schaik F. Safety, tolerability and pharmacokinetics of PL14736, a novel agent for treatment of ulcerative colitis, in healthy male volunteers. *Gut* 2003; 51: A309.
54. Vuksic T, Zoricic I, Brcic L, Sever M, Klicek R, Radic B, Cesarec V, Berkopic L, Keller N, Blagaic AB, Kokic N, Jelic I, Geber J, Anic T, Seiwert S, Sikiric P. Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in trials for inflammatory bowel disease (PL-10, PLD-116, PL14736, Pliva, Croatia) heals ileoileal anastomosis in the rat. *Surg Today* 2007;37:768-77

11. BIOGRAFIJA

Rodena sam 13. listopada 1971. godine u Zagrebu, gdje sam se školovala i danas živim. Medicinski fakultet upisala sam 1990. godine u prvoj generaciji šestogodišnjeg studija i završila ga u prvom roku. Nakon obavljenog liječničkog staža i položenog državnog ispita zapošljavam se u Ustanovi za hitnu medicinsku pomoć kao liječnik na terenu. Tamo provodim naredne dvije godine (1997- 1999). Ljubav prema kirurgiji rezultirala je ranim volonterskim radom- još za vrijeme studija na Klinici za plastičnu i rekonstruktivnu kirurgiju, KBC Rebro, Klinici za kirurgiju Univerzitetske klinike u Hamburgu te nakon fakulteta paralelno sa zaposlenjem u Ustanovi za hitnu medicinsku pomoć tijekom dvije godine- na dječjoj kirurgiji Klinike za dječje bolesti Zagreb. Nakon dobivene specijalizacije iz dječje kirurgije zapošljavam se u Klinici za dječje bolesti Zagreb, a specijalistički ispit polažem 2004. godine. Tijekom specijalizacije završavam poslijediplomski studij Zaštita majke i djeteta, te razlikovnu godinu na doktorskom studiju Biomedicina i zdravstvo. Magistarski rad pod naslovom "Vrijednost C- reaktivnog proteina u akutnom apendicitisu kod djece" obranila sam 2006. godine čime stječem titulu magistra znanosti. Stručno usavršavanje provodim u Cincinnati Children's Medical Centru, SAD kao član transplatacijskog tima, te na Univerzitetu Johns Hopkins u Baltimoru gdje završavam i tečaj Advanced Pediatric Life Support. Završavam workshop iz dječje endoskopske kirurgije u Leedsu (Engleska), te laparoskopski kolorektalni masterclass u Elancourtu u Francuskoj. Od 2004. godine radim kao specijalistica dječje kirurgije na Odjelu za novorođenčad i dojenčad Klinike za dječje bolesti Zagreb, a 2006. godine počinjem rad na doktorskoj disertaciji. Autorica sam nekoliko stručnih i znanstvenih članaka, od kojih su 3 objavljena u CC-u.

Privatno sam sretna supruga i majka dvoje djece.